

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
10 janvier 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/02811 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12Q 1/68,  
1/70

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/02191

(22) Date de dépôt international : 6 juillet 2001 (06.07.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/08839 6 juillet 2000 (06.07.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : BIO  
MERIEUX (FR/FR); Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy  
L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : RENAUD,  
Patricia (FR/FR); 21 bis, rue Victor Hugo, Résidence  
Les Cascades, F-78230 Le Pecq (FR). GUILLOT, Em-  
manuelle (FR/FR); 23 bis rue, de Turville, F-78100  
Saint Germain en Laye (FR). MABILAT, Claude  
(FR/FR); 5, rue du Manoir, F-69650 Saint Germain au  
mont d'Or (FR). VACHON, Carole (FR/FR); 37 bis  
rus, Descartes, F-69100 Villeurbanne (FR). LACROIX,  
Brano (FR/FR); 93, Route de Vourles, F-69230 Saint

Genis Laval (FR). VERNET, Guy (FR/FR); Montée  
du Vieux Château, F-69250 Albigny sur Saone (FR).  
ARMAND, Marie-Astrid (FR/FR); 4, impasse Van  
Gogh, F-38230 Charvieu Chavagneux (FR). LAFFAIRE,  
Philippe (FR/FR); 5, impasse des Courtis, F-38230 Tig-  
nien Jamezieux (FR).

(74) Mandataire : DIDIER, Mireille; Cabinet Germain &  
Maureau, Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06  
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet eurasiatique  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR CONTROLLING THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF AN AQUEOUS MEDIUM AND KIT  
THEREFOR

(54) Titre : PROCÉDE DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE D'UN MILIEU AQUEUX ET NECESSAIRE  
APPROPRIÉ

(57) Abstract: The invention concerns a method for controlling the microbiological quality of an environmental aqueous medium, suspected of containing various micro-organisms, comprising the following steps: selecting a reference set, consisting of at least three micro-organisms, representing jointly or separately, a microbiological quality level; providing a microbiological detection kit, consisting of at least three probes specifically and respectively identifying said three micro-organisms; after treating the medium to be analysed, contacting said micro-organisms, or any fraction thereof derived from the medium to be analysed therefrom, with said detection kit, whereby a multiple determination of said micro-organisms is carried out, said determination representing the microbiological quality level of the medium. The invention also concerns an appropriate microbiological detection kit for implementing said method.

(57) Abrégé : Procédé de contrôle de la qualité microbiologique d'un milieu aqueux environnemental, susceptible de comporter différents micro-organismes, comprenant les étapes suivantes: on choisit un ensemble de référence, constitué d'au moins trois micro-organismes, représentatifs, ensemble ou séparément, d'un niveau de qualité microbiologique, on dispose d'un nécessaire de détermination microbiologique, constitué d'au moins trois sondes d'identification spécifique et respectivement desdits trois microorganismes, après traitement du milieu à analyser, on met lesdits microorganismes, ou toute fraction obtenue à partir de ces derniers, en contact avec ledit nécessaire de détermination, moyennant quoi on multi-détermine lesdits microorganismes, cette détermination étant représentative du niveau de qualité microbiologique du milieu. Nécessaire de détermination microbiologique approprié pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention.

WO 02/02811 A2



— avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

## PROCEDE DE CONTRÔLE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE D'UN MILIEU AQUEUX ET NECESSAIRE APPROPRIE

La présente invention relève du domaine du diagnostic microbiologique, des techniques de détection permettant l'identification et la quantification de microorganismes présents dans des fluides et produits  
5 comme par exemple les eaux.

Elle concerne également des nécessaires de dosage et des procédés, permettant ces identifications et quantifications de microorganismes sur des échantillons de volumes importants, en des temps inférieurs à la  
10 journée, et permettant éventuellement un contrôle en suivi de production, voire un asservissement des techniques de purification et de production aux résultats de ces dosages.

Les méthodes classiques d'identification microbiologique requièrent une étape de culture sur milieux sélectifs suivie en général d'une identification, selon des caractéristiques morphologiques, biochimiques, et/ou  
15 immunologiques.

Ces méthodes sont longues, un jour à plusieurs semaines pour des bactéries à croissance lente, par exemple 10 à 12 jours pour *Legionella*, jusqu'à un mois pour les Mycobactéries, peu spécifiques, et peu sensibles  
20 quand elles sont appliquées à un échantillon complexe polymicrobien (eau, environnement, aliments). De plus, elles ne permettent pas de détecter les bactéries viables non cultivables (VBNC) stressées par des facteurs environnementaux ou des traitements de désinfection, et ne se prêtent pas à l'automatisation.

Depuis plus de dix ans, les méthodes de biologie moléculaire, en particulier celles basées sur l'amplification enzymatique *in vitro* (PCR) et l'utilisation de sondes oligonucléotidiques ont révolutionné le diagnostic microbiologique.

Grâce à leur rapidité, sensibilité et spécificité, elles constituent une  
30 alternative aux méthodes classiques pour détecter en particulier des microorganismes indicateurs ou pathogènes dans des échantillons d'eau ou tout échantillon, permettant de détecter la présence de tels microorganismes dans l'environnement.

Parmi les méthodes de biologie moléculaire utilisées pour détecter  
35 en particulier des microorganismes indicateurs ou pathogènes dans des échantillons d'eau ou tout échantillon, permettant de détecter la présence de

tels microorganismes dans l'environnement, on peut citer notamment les suivantes.

5 Pour la détection des indicateurs de contamination fécale (coliformes totaux, thermotolérants, *E coli*) usuellement recherchés dans le contrôle sanitaire de l'eau, des tests rapides basés sur une PCR-hybridation avec une sonde ont été développés pour des échantillons d'eau potable notamment [Bej, A.K. et al. Appl. Environ. Microbiol, 1990, n° 56, p. 307-314] [Fricker, E.J. et al., Letters in Applied Microbiology, 1994, n° 19, p. 44-46].

10 Ces indicateurs de contamination fécale ne permettent cependant pas de prédire la présence de contamination bactérienne d'origine non fécale (*Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella*...) ainsi que de contaminations non bactériennes (virus et parasites).

Des tests de détection moléculaire basés sur la PCR pour rechercher spécifiquement des microorganismes pathogènes (bactéries, virus  
15 parasites) ont donc été développés.

Dans le domaine de la détection des bactéries, on notera notamment le brevet européen EP-A-0 438 115 qui décrit une méthode de détection des microorganismes pathogènes *Legionella* et des indicateurs de contamination fécale, via une étape d'amplification enzymatique in vitro dans  
20 des échantillons aquatiques environnementaux.

Plusieurs publications font également état de tests PCR pour détecter les Salmonelles dans l'eau et l'environnement, [Way, J.S. et al., Appl. Environm. Microbiol., 1993, n° 59, p. 1473-1479] [Waage, A.S. et al., Appl. Microbiol., 1999, n° 87, p. 418-426], de même que les *Légionelles* [Bej, A.K.,  
25 Appl. Environ. Microbiol., 1991, n° 57, p. 2429-2432],

Dans US-B-5,298,392 la détection d'indicateurs de contaminations fécales et pathogènes est décrite.

Dans le domaine de la détection des virus, leur présence n'étant pas corrélée à celle des indicateurs de contamination fécale traditionnellement  
30 recherchés dans le contrôle sanitaire de l'eau, des méthodes d'analyse rapides et efficaces sont nécessaires notamment pour le contrôle des contaminations virales des eaux.

Les méthodes conventionnelles pour détecter les virus dans l'eau et l'environnement requièrent une étape de culture cellulaire animale, méthode  
35 longue, lourde et contraignante, restreinte à quelques familles de virus.

De nombreuses méthodes basées sur une étape d'amplification enzymatique ont été décrites pour rechercher les virus pathogènes dans l'eau et l'environnement. A titre d'exemples, on pourra citer, pour la détection par RT-PCR des Enterovirus, Hépatite A et Rotavirus, dans des échantillons d'eau [Abbaszadegan M. et al., Appl. Environ. Microbiol., 1997, n° 63(1), p. 324-328] et [Gilgen M. et al., International Journal of food Microbiology, 1997, n° 37, p. 189-199]

Dans le domaine de la détection des parasites notamment pour la détection de *Giardia* et *Cryptosporidium* qui sont deux parasites, dont la transmission dans l'eau et l'environnement sous une forme enkystée (oocyste et cyste) les rend particulièrement résistants aux traitements classiques de désinfection comme la chloration, des méthodes conventionnelles standardisées (EPA 1622-1623 et DWI) ont été mises au point. Elles comprennent une étape de filtration suivie d'une capture immunomagnétique (IMS) des oocystes et d'une détection par immunofluorescence (IFA). Ces méthodes sont longues, fastidieuses, non spécifiques des espèces pathogènes pour l'homme (*Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum*) et ne permettent pas de déterminer la viabilité des parasites détectés.

Des méthodes moléculaires plus rapides, sensibles et spécifiques basées sur une étape d'amplification enzymatique (PCR) ont été décrites.

Dans WO-A-94/02635, WO-A-97/02281 et US-A-5,693,472 des amorces et sondes pour détecter l'espèce *C. parvum* dans des échantillons aquatiques et/ou biologiques sont décrits.

EP-A-0 453 290 et US-A-5,558,989 décrivent une méthode de détection de l'espèce pathogène chez l'homme, *Giardia lamblia*, basée sur l'utilisation de sondes nucléiques (ADN et/ou ARN) correspondant à la séquence de 18S rRNA. EP-A-0 550 883 décrit un test PCR avec réactifs pour rechercher *G. lamblia* dont la sensibilité est de 1-5 oocystes / ml de concentrat d'eau.

Des méthodes moléculaires distinguant les parasites morts des parasites viables et/ou infectieux permettant ainsi de mieux apprécier le risque sanitaire réel posé par la présence de ces parasites dans l'eau ont été décrites.

On citera notamment WO-A-97/42349 qui concerne la détection des *Cryptosporidium* et *Giardia* viables (par détection des ARNm des protéines de chocs thermiques hsp 70) et/ou infectieux (culture cellulaire et amplification enzymatique) et US-A-5,556,774 qui concerne une méthode de détection des

*Cryptosporidium* viables par combinaison d'une étape PCR et une étape d'excystation in vitro.

Si les principales méthodes moléculaires citées ci-dessus pour rechercher des indicateurs de contamination et des microorganismes pathogènes incluant des bactéries, parasites, et virus sont beaucoup plus performantes que les méthodes classiques en termes de rapidité, sensibilité et spécificité, elles ne ciblent qu'un type de micro-organisme par test.

Aussi pour mesurer ou détecter plusieurs paramètres il faudrait mettre en œuvre autant de tests spécifiques, que de paramètres à mesurer ou détecter, ce qui rend une analyse microbiologique complète extrêmement lourde.

Quelques approches de multidétection ont été décrites mais leur capacité de multidétection est faible puisqu'elles ne détectent au maximum que 3 paramètres.

On citera en particulier la technique de multiplex PCR qui consiste à réaliser plusieurs réactions PCR dans le même tube.

A titre d'exemple dans [Bej, A.K. et al., Appl. Environ. Microbiol., 1991, n° 57, p. 597-700] on décrit la détection simultanée de *Legionella* et *L. pneumophila* et la détection simultanée sur *E. coli*, *Salmonella* et *Shigella*, dans [Bej, A.K. et al., Appl. Environ. Microbiol., 1991, n° 57, p. 2429-2432] la détection simultanée des coliformes totaux, *E. coli* et *Shigella*, et dans EP-A-0 438 115 la détection des Legionelles et indicateurs de contamination fécales.

La technique d'hybridation in situ (FISH) réalisée avec deux ou au maximum trois sondes fluorescentes peut permettre de détecter plusieurs paramètres simultanément mais avec une sensibilité moins élevée que les méthodes d'amplification enzymatique citées ci-dessus.

Dans la publication [Eggers, M. et al., Presented at the 27<sup>th</sup> International Conference on Environmental Systems, 1997], on décrit une approche pour détecter simultanément des microorganismes de l'eau et l'air dans l'espace. Cette approche ne cible que les bactéries, par exemple *E. coli* et *Vibrio proteolyticus*, par hybridation directe de l'ARNr 16S sur un support solide (microplaque à 96 puits). Il n'y a pas d'étape d'amplification enzymatique aussi la sensibilité est peu élevée, et la capacité de multidétection est restreinte à quelques microorganismes, néanmoins une méthode de multidétection dans l'eau et l'air utilisant une technique apparentée aux biopuces est décrite.

Avant de poursuivre, et pour la clarté et la bonne compréhension, différents termes utilisés dans la description et les revendications nécessitent d'être définis.

- Un fragment nucléotidique, ou un oligonucléotide, ou un polynucléotide, est un enchaînement de motifs nucléotidiques assemblés entre eux par des liaisons ester phosphorique, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à un fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique.

- Un motif nucléotidique est dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée ; dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose, dans l'ARN le sucre est le ribose ; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou de l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs précités ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide [P.E. Nielsen et al, Science, 1991, n° 254, p. 1497-1500], soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les diphosphates, alkyl- et aryl-phosphonates et phosphorothioates.

- Par "séquence « informationnelle », on entend toute suite ordonnée de motifs de type nucléotidique, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information de même qualité que celle des acides nucléiques naturels.

- Par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires sont susceptibles de former un double brin avec des liaisons hydrogène stables et spécifiques. Un fragment nucléotidique « capable de s'hybrider » avec un polynucléotide est un fragment

pouvant s'hybrider avec ledit polynucléotide dans des conditions d'hybridation, qui peuvent être déterminées dans chaque cas de façon connue. Les conditions d'hybridation sont déterminées par la stringence, c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation est d'autant plus spécifique  
5 qu'elle est effectuée à plus forte stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux acides nucléiques.

La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans  
10 la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépendra principalement des sondes utilisées. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier.

15 En général, selon la longueur des sondes utilisées, la température pour la réaction d'hybridation est comprise entre environ 20 et 65°C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,8 à 1 molaire.

- Une sonde est un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100  
20 monomères, notamment de 6 à 35 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un fragment nucléotidique ayant, par exemple, une séquence nucléotidique comprise dans un ARN ribosomique, l'ADN obtenu par transcription inverse dudit ARN ribosomique et l'ADN (appelé ici ADN  
25 ribosomique ou ADN<sub>r</sub>) dont ledit ARN ribosomique est le produit de transcription ; une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic (notamment sondes de capture ou de détection).

- Une sonde de capture est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou  
30 indirectement, par exemple par covalence ou adsorption.

- Une sonde de détection peut être marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes (notamment une peroxydase, une phosphatase alcaline, ou une enzyme susceptible  
35 d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent), des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes



ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et des ligands tels que la biotine.

- Une amorce est une sonde comprenant de 5 à 100, préférentiellement de 10 à 40 motifs nucléotidiques et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé de séquençage, dans une méthode de transcription inverse, etc...

- L'identité entre un fragment et une séquence de référence, qui caractérise le degré d'identité entre ledit fragment et ladite séquence, est mesuré par alignement dudit fragment sur ladite séquence puis détermination du nombre de monomères identiques entre les deux.

Les sondes et amorces selon l'invention sont choisies parmi :

(a) les séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description,

(b) tout fragment des séquences (a), à la fois, comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque des séquences (a) et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite séquence (a) ; à titre d'exemple, un fragment (b) comporte 10 nucléotides parmi lesquels 5 nucléotides contigus appartiennent à une séquence (a) et au moins 2 nucléotides des 5 nucléotides restants sont identiques respectivement aux deux nucléotides correspondants dans la séquence de référence, après alignement.

- Par séquence d'identification, on désigne toute séquence ou tout fragment tel que défini ci-dessus, pouvant servir de sonde de détection et/ou de capture.

- Par traitement du milieu aqueux, on entend toute étape de filtration et/ou de lyse et/ou de purification.

- Par étape de lyse, on entend une étape capable de libérer les acides nucléiques contenus dans les enveloppes protéiques et/ou lipidiques des microorganismes (comme des débris cellulaires qui perturbent les réactions ultérieures). A titre d'exemple, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrites dans les demandes de brevet de la Demanderesse :

WO-A-00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique,

WO-A-99/53304 sur la lyse électrique, et

WO-A-99/15321 sur la lyse mécanique.

L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les lyses chimiques par des agents chaotropiques tels que les sels de guanidium (US-A-5,234,809).

- 5 - Par étape de purification, on entend la séparation entre les acides nucléiques des micro-organismes et les constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse. Cette étape permet généralement de concentrer les acides nucléiques. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques éventuellement revêtues d'oligonucléotides, par adsorption ou covalence (voir  
10 à ce sujet les brevets US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces  
15 particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet déposées par la Demanderesse sous les références suivantes : WO-A-97/45202 et WO-A-99/35500.

- Dans la dernière de ces demandes de brevet, il s'agit de particules magnétiques thermosensibles ayant chacune un noyau magnétique recouvert  
20 d'une couche intermédiaire. La couche intermédiaire est elle-même recouverte par une couche externe à base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, le polymère externe est thermosensible et présente une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 10 et 100°C et de préférence entre 20 et 60°C.  
25 Cette couche externe est synthétisée à partir de monomères cationiques, qui génèrent un polymère ayant la capacité de lier les acides nucléiques. Cette couche intermédiaire isole les charges magnétiques du noyau, afin d'éviter les problèmes d'inhibition des techniques d'amplification de ces acides nucléiques.

- Un autre exemple intéressant de méthode de purification des  
30 acides nucléiques est l'utilisation de silice soit sous forme de colonne (kits Qiagen par exemple), soit sous forme de particules inertes [Boom R. et al., J. Clin. Microbiol., 1990, n°28(3), p. 495-503] ou magnétiques (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSil™ Paramagnetic particles). D'autres méthodes très répandues reposent sur des résines échangeuses d'ions en colonne (kits  
35 Qiagen par exemple) ou en format particulaire paramagnétique (Whatman: DEAE-Magarose) [Levison PR et al., J. Chromatography, 1998, p. 337-344].

Une autre méthode très pertinente pour l'invention est celle de l'adsorption sur support d'oxyde métallique (société Xtrana: matrice Xtra-Bind™).

- Par étape de détection on entend soit une détection directe par une méthode physique, soit une méthode de détection à l'aide d'un marqueur.

- 5 De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques. [Voir par exemple Kricka et al., Clinical Chemistry, 1999, n° 45(4), p.453-458 ou Keller G.H. et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6, p.173-249].

- Dans un premier mode de réalisation de l'invention, une méthode d'hybridation à l'aide de sondes spécifiques est mise en œuvre pour l'étape de détection. Ce mode d'exécution particulier consiste à mettre en contact les acides nucléiques, amplifiés ou non, des micro-organismes à détecter avec une sonde de capture fixée sur un support solide, et capable de s'hybrider spécifiquement avec lesdits acides nucléiques; puis à révéler, selon les méthodes connues, la présence éventuelle des acides nucléiques fixés au support solide notamment par l'intermédiaire d'au moins une sonde de capture.

- Par "marqueur", on entend un traceur capable d'engendrer un signal. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la bêtagalactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase; les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents ou colorants; les groupements à densité électronique détectable par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures d'impédance; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc.; les molécules radioactives comme  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^{125}\text{I}$ .

- Ainsi, le polynucléotide peut être marqué pendant l'étape d'amplification enzymatique, par exemple en utilisant un nucléotide triphosphate marqué pour la réaction d'amplification. Le nucléotide marqué sera un désoxyribonucléotide dans les systèmes d'amplification générant un ADN, comme la PCR, ou un ribonucléotide dans les techniques d'amplification générant un ARN, comme les techniques TMA ou NASBA.

Le polynucléotide peut aussi être marqué après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde marquée selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO-A-91/19812.

Un autre mode particulier préférentiel de marquage d'acides nucléiques est décrit dans la demande FR-A-2 780 059 de la Demanderesse. Un autre mode préférentiel de détection utilise l'activité exonucléase 5'-3' d'une polymérase tel que décrit par Holland P.M., PNAS (1991) p 7276-7280.

Des systèmes d'amplification du signal peuvent être utilisés comme décrit dans le document WO-A-95/08000 et, dans ce cas, la réaction préliminaire d'amplification enzymatique peut ne pas être nécessaire.

- Par amplification enzymatique, on entend un processus générant de multiples copies d'un fragment nucléotidique particulier à l'aide d'amorces spécifiques par l'action d'au moins une enzyme. Ainsi, pour l'amplification des acides nucléiques, il existe, entre autres, les techniques suivantes :
- 15 - PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159,
- LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0 201 184,
- RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet  
20 WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, et
- 25 - TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

On parle alors d'amplicons pour désigner les polynucléotides générés par une technique d'amplification enzymatique.

- Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux  
30 sur lesquels peut être immobilisé un acide nucléique. Des matériaux de synthèse, ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose, ou le dextran ;  
35 des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques

telles que le nylon ; des matériaux minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande  
5 WO -A-94/12670, d'une particule ou d'une biopuce.

- Par "biopuce", on entend un support solide de dimension réduite où sont fixés une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées.

A titre d'illustration, des exemples de ces biopuces sont donnés  
10 dans les publications de [G. Ramsay, Nature Biotechnology, 1998, n°16, p. 40-44 ; F. Ginot, Human Mutation, 1997, n°10, p.1-10 ; J. Cheng et al, Molecular diagnosis, 1996, n°1(3), p.183-200 ; T. Livache et al, Nucleic Acids Research, 1994, n° 22(15), p. 2915-2921 ; J. Cheng et al, Nature Biotechnology, 1998, n° 16, p. 541-546] ou dans les brevets US-A-4,981,783, US-A-5,700,637, US-A-  
15 5,445,934, US-A-5,744,305 et US-A-5,807,522.

La caractéristique principale du support solide doit être de conserver les caractéristiques d'hybridation des sondes de capture sur les acides nucléiques tout en générant un bruit de fond minimum pour la méthode de détection. Un avantage des biopuces est qu'elles simplifient l'utilisation de  
20 nombreuses sondes de capture permettant ainsi la détection multiple de micro-organismes à détecter tout en tenant compte du polymorphisme desdits micro-organismes à détecter

L'invention décrite ci-après permet de résoudre les problèmes posés par les méthodes précédemment décrites, à la fois en terme de  
25 sensibilité, spécificité et capacité de multidétection, tout en étant rapide et facile à mettre en œuvre.

Un premier objet de l'invention est un procédé de contrôle de la qualité microbiologique d'un milieu aqueux environnemental, susceptible de comporter différents micro-organismes, comprenant les étapes suivantes :

30 - on choisit un ensemble de référence, constitué d'au moins trois micro-organismes, représentatifs, ensemble ou séparément, d'un niveau de qualité microbiologique,

- on dispose d'un nécessaire de détermination microbiologique, constitué d'au moins trois sondes d'identification spécifiquement et  
35 respectivement desdits trois microorganismes,

- après traitement du milieu à analyser, on met - lesdits microorganismes, ou toute fraction obtenue à partir de ces derniers, en contact avec ledit nécessaire de détermination, moyennant quoi on multi-détermine lesdits microorganismes,

- 5           cette détermination étant représentative du niveau de qualité microbiologique du milieu.

L'invention concerne aussi un nécessaire de détermination microbiologique comprenant un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites, lesdites sondes d'identification étant  
10           chacune spécifiques d'une espèce ou au moins d'un genre de bactérie, virus ou parasite susceptible d'être présent dans un échantillon de liquide à doser.

Selon l'invention, un nécessaire désigne toute méthode manuelle, semi-automatique ou automatique permettant la mise en œuvre d'un moyen de dosage, dosage signifiant l'identification et/ou la détermination de la viabilité  
15           et/ou la quantification, chacun de ces trois paramètres étant déterminés en séquence ou selon les combinaisons : identification seule ; identification et quantification ; identification et viabilité ; identification, quantification et viabilité.

Cette invention concerne également une méthode de multidétection utilisant en particulier la technique des biopuces pour rechercher un grand  
20           nombre des paramètres microbiologiques incluant des indicateurs de contamination exigés dans les différentes législations (USA, France, Europe) et des microorganismes pathogènes incluant des bactéries, virus et parasites.

En une seule mise en œuvre une analyse microbiologique complète d'un échantillon peut être réalisée avec rapidité en par exemple  
25           environ 4 heures et avec une grande sensibilité par exemple de l'ordre de 1micro cible/10l-100l grâce à l'étape d'amplification enzymatique.

Cette méthode de multidétection est spécifique des espèces recherchées grâce à l'utilisation de séquences, dites séquences d'identification de chaque espèce, comme sonde, et peut permettre de déterminer la viabilité  
30           des microorganismes par la détection de marqueurs de viabilité comme par exemple, ARNr et/ou ARNm.

La rapidité, la sensibilité et la spécificité de cette méthode de multidétection, permettent de l'appliquer indifféremment à tout milieu aqueux environnemental, c'est à dire tout milieu aqueux à l'exclusion de tout fluide  
35           corporel. En particulier cette méthode s'applique à toute eau destinée à la consommation humaine, eaux propres industrielles, eaux résiduaires urbaines

et industrielles, eaux de l'industrie agro-alimentaire, eaux de process et à tout fluide ou produit.

Cette détection simultanée en une seule étape de multiples produits d'amplifications spécifiques, est possible grâce à l'utilisation de support solide en particulier sous la forme d'un support solide de dimension réduite où sont fixées une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées, ou « biopuce », ces sondes de capture étant constituées par un jeu de fragments ou de la totalité de séquences nucléotidiques spécifiques dites séquences d'identification des microorganismes recherchés.

Ces séquences d'identification ou ces fragments peuvent également être mis en œuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues comme les techniques de dépôt ponctuel sur filtre dites "DOT-BLOT" [Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982], les techniques de transfert d'ADN dites "SOUTHERN BLOT" [Southern E. M., J. Mol. Biol., 1975, 98, 503], les techniques de transfert d'ARN dites "NORTHERN BLOT", ou les techniques "SANDWICH" [Dunn A.R. et al., Cell, 1977, 12, 23].

Parmi les microorganismes recherchés, on citera à titre d'exemple les microorganismes suivants :

Parmi les bactéries :

*Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE 0157:H7, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus epidermatitis*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, le genre *Mycobacterium*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae*, le genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, le genre *Salmonella*.

Parmi les virus et plus particulièrement parmi les *Adenovirus*, les *Adeno virus 40*, et les *Adeno virus 41bis* ;

les *Astrovirus*, *HastV-1-2* ;

les *Enterovirus*, tels que *Poliovirus*, *Coxsackievirus*, ou *Echovirus*, les *Rotavirus*,

les *Calicivirus*, tels que *Virus de Norwalk*, *Virus de Sapporo*,  
et les virus de l'Hépatite tels que le virus de l'Hépatite A,

Parmi les parasites :

- Le genre *Cryptosporidium*, tel que *Cryptosporidium parvum*, le  
5 genre *Giardia*, tel que *Giardia lamblia* et les *Microsporidies*.

Les microorganismes peuvent être recherchés au niveau du genre  
auquel ils appartiennent soit au niveau taxonomique inférieur c'est à dire au  
niveau de l'espèce, soit au niveau des sérotypes, des sous-types et en  
épidémiologie : par exemple pour *Legionella* la détermination pourra être  
10 effectuée par la séquence d'identification SEQ ID NO:9 pour la recherche au  
niveau du genre et par SEQ ID NO:10 ou 11 pour une détermination par une  
séquence d'identification spécifique de la bactérie *Legionella pneumophila*.

Les séquences matérialisées sur la biopuce, dites séquences  
d'identification correspondant aux espèces recherchées seront choisies parmi  
15 les séquences dont la liste est jointe en annexe de SEQ ID NO:1 à SEQ ID  
NO:104.

Des variantes de mises en œuvre du procédé selon l'invention sont  
ci-après exposées.

Le nécessaire de détermination microbiologique exposé aux  
20 microorganismes du milieu aqueux répond avantageusement à l'une  
quelconque des présentations suivantes :

Les trois sondes d'identification qu'il comprend ont au moins une  
séquence choisie parmi l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos :1-104,  
et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus  
25 inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente  
au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Il comprend au moins une sonde d'identification spécifique à une  
bactérie, au moins une sonde d'identification spécifique à un parasite et au  
moins une sonde d'identification spécifique à un virus ; de préférence, il  
30 comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO :1 à  
SEQ ID NO :39, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66 à SEQ ID  
NO:69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères  
contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence  
présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; au moins  
35 une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49,  
SEQ ID NO :63 à SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant



au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; et au moins une séquence choisie parmi entre SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, et SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Il comprend au moins quatre sondes d'identification spécifiques à au moins quatre bactéries différentes ; de préférence, elles sont choisies parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66 à SEQ ID NO:69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Il comprend au moins cinq sondes d'identification spécifiques à au moins cinq virus différents ; de préférence, elles sont choisies parmi SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, et SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins deux sondes d'identification spécifiques à au moins deux parasites ; de préférence, elle est choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49 et SEQ ID NO:63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins une sonde d'identification spécifique à une bactérie et au moins une sonde d'identification spécifique à au moins un parasite. De préférence, il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:67 à SEQ ID NO:69, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, et au moins une sonde d'identification comprise SEQ ID NO:40 à

SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

5 Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes : *Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*. De préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères  
10 contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes : *Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*. De préférence, au moins une sonde d'identification dudit nécessaire est choisie  
15 parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au  
20 moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Genre *Cryptosporidium*. De préférence, au moins une sonde dudit nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments  
25 de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.  
30

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Gardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*. De préférence, au moins une sonde dudit nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:46 à SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 et SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au  
35

moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Enterovirus*, *Genre Cryptosporidium*, De préférence, au moins une sonde d'identification dudit nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Genre Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus: virus de la poliomyélite*, *virus coxsackie A et B*, *Echovirus*, *Genre Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *genre Giardia*, *Giardia lamblia*. De préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61 à SEQ ID NO:75, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Genre Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus: virus de la poliomyélite*, *virus coxsackie A et B*, *Echovirus*, *Genre Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *genre Giardia*, *Giardia lamblia*, *Genre Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Virus de l'hépatite A*, *Calicivirus: Norwalk et*

Sapporo Virus, Adenovirus, Rotavirus. De préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157:H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus: virus de la poliomyélite*, *virus coxsackie A et B*, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Virus de l'hépatite A*, *Calicivirus: Norwalk* et *Sapporo Virus*, *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, Genre *Mycobactéries*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Astrovirus*. De préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE 0157:H7, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter coli*,

- Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, le genre *Mycobactéries*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*,  
 5 *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae*, le genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, le genre *Salmonella*.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :

- 10 les *Adenovirus*, tels que *Adeno virus 40*, *Adeno virus 41bis*;  
 les *Astrovirus*, *HAstV-1-2*;  
 les *Enterovirus*, tels que *Poliovirus*, *Coxsackievirus*, *Echovirus*,  
 les *Rotavirus*,  
 les *Calicivirus*, tels que *Virus de Norwalk*, *Virus de Sapporo*, et les  
 15 virus de l'Hépatite tel que le virus de l'Hépatite A.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les parasites suivants :

Le genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia lamblia* et les *Microsporidies*.

- 20 Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*,  
 25 *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Virus de l'hépatite A*. De préférence, au moins une  
 30 sonde d'identification du nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:97, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5  
 35 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont

la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*,  
 5 *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*,  
 10 *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A. De préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ  
 15 ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:97, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque  
 20 séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes :

*Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7, genre *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, genre *Mycobacterium*, genre  
 25 *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*. De préférence au moins une sonde d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5  
 30 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :

35 *Virus de l'hépatite A*, *Enterovirus*, et au moins un virus choisi parmi les *Calicivirus* et les *Rotavirus*. De préférence au moins une sonde

d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO 59, SEQ ID NO :60 SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 96, SEQ ID NO :98 à SEQ ID NO :104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :

*Virus de l'hépatite A, Enterovirus, au moins un virus choisi parmi le virus de Norwalk et les Rotavirus.* De préférence au moins une sonde d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO :60, SEQ ID NO :97, SEQ ID NO :70 à SEQ ID NO :75, SEQ ID NO 76 à SEQ ID NO 96, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les parasites suivants : *genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, genre Giardia, Giardia Lambli*a. De préférence au moins une sonde d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi :

*Escherichia coli, Escherichia coli SEROTYPE O157:H7, genre Salmonella, Pseudomonas aeruginosa, genre Mycobacterium, genre Legionella, Legionella pneumophila, Staphylococcus aureus, Virus de l'hépatite A, Enterovirus, et au moins un virus choisi parmi les Calicivirus et les Rotavirus, genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, genre Giardia, Giardia Lambli*a ; de préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO:14 , SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO :60 SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 96,

SEQ ID NO :98, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, ou

- 5        *Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7, genre *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, genre *Mycobacterium*, genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, Virus de l'hépatite A, *Enterovirus*, et au moins un virus choisi parmi le virus de Norwalk et les *Rotavirus*, genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*,  
10        *Giardia Lamblia* ; de préférence, au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14 , SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:70 à  
15        SEQ ID NO :75, SEQ ID NO 76 à SEQ ID NO 96, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

- 20        Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi Virus de Norwalk, Virus Hepatitis A, *Enterovirus*. De préférence, au moins une sonde d'identification choisie parmi parmi SEQ ID NO 59, SEQ ID NO :60, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 75.

25

- Les sondes de capture comportent avantageusement au moins 10, de préférence au moins 13, voire au moins 15, même au moins 17 bases et/ou au plus 35, de préférence au 25, voire au plus 20. Par exemple, une sonde de capture comporte entre 10 et 35 bases, avantageusement entre 17 et 20  
30        bases, avec au moins une position d'interrogation située dans la région centrale de la séquence connue, en 12<sup>ème</sup> position par rapport à l'extrémité 3' de la séquence. Pour les espèces *E. coli* et *E. faecalis*, il y aura de préférence des sondes de capture de 17 bases, avec 2 positions d'interrogations : une en 10<sup>ème</sup> et une en 8<sup>ème</sup> position. Ces sondes de capture ont, suivant le cas des  
35        longueurs comprises entre 10 et 25 nucléotides. Les positions d'interrogation varient alors en fonction de la longueur de la sonde de capture.



Les séquences spécifiques dites séquences d'identification, ont été sélectionnées par des techniques de sélection informatique et sont chacune suffisamment spécifique d'une espèce et/ou d'un membre d'une espèce qu'elles permettent de discriminer des genres taxonomiquement proches et/ou des espèces du même genre et d'éviter les phénomènes d'hybridation croisée.

Dans un mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites comprenant au moins quatre sondes d'identification spécifiques à au moins quatre bactéries différentes.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites comprenant au moins cinq sondes d'identification spécifiques à au moins cinq virus différents.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites comprenant au moins deux sondes d'identification spécifique à un parasite.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites comprenant au moins une sonde spécifique d'une bactérie et au moins une sonde d'identification spécifique d'un parasite.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes spécifiques des bactéries sont choisies parmi les sondes spécifiques des bactéries suivantes :

*Escherichia coli*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes spécifiques des bactéries sont choisies parmi les sondes spécifiques des bactéries suivantes :

*Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification

de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes spécifiques des bactéries sont choisies parmi les sondes spécifiques des bactéries suivantes :

*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
*Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus*  
 5 *equinus*, *Clostridium perfringens*.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes spécifiques des bactéries sont choisies parmi les sondes spécifiques des bactéries suivantes :

10 *Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE 0157:H7, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*,  
 15 *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, le genre *Mycobactéries*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium*  
 20 *gordonae*, le genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, le genre *Salmonella*.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes suivants :

25 *Escherichia coli*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Genre *Cryptosporidium*.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes suivants :

30 Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Gardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes suivants :

35

- Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
*Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus*  
*equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,  
*Enterovirus* : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre  
 5 *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*,

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de  
 détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification  
 de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes  
 suivants :

- 10 *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
*Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus*  
*equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,  
*Enterovirus* : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre  
*Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*,  
 15 *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*,  
*Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de  
 l'hépatite A, *Calicivirus* : Norwalk et Sapporo Virus, *Adenovirus*, *Rotavirus*.

- Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de  
 détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification  
 20 de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes  
 suivants :

- Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
*Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus*  
*equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,  
 25 *Enterovirus* : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre  
*Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*,  
*Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*,  
*Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de  
 l'hépatite A, *Calicivirus* : Norwalk et Sapporo Virus, *Adenovirus*, *Rotavirus*,  
 30 *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, Genre *Mycobactéries*,  
*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*,  
*Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*,  
*Mycobacterium gordonae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus*  
*epidermidis*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas*  
 35 *maltophilia*, *Astrovirus*.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes suivants :

5                   *Escherichia coli, Enterovirus, Genre Cryptosporidium,*

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes d'identification spécifiques des virus sont spécifiques des virus suivants :

10                   *les Adenovirus, tel que Adeno virus 40, Adeno virus 41bis;*  
                    *les Astrovirus, HastV-1-2;*  
                    *les Enterovirus, tels que Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus,*  
                    *les Rotavirus,*  
                    *les Calicivirus, tels que Virus de Norwalk, Virus de Sapporo et,*  
15                   *les virus de l'Hépatite tel que le virus de l'Hépatite A.*

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes spécifiques des parasites sont choisies parmi les sondes spécifiques des parasites suivants :

20                   *Le genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, Giardia lamblia et les Microsporidies.*

Selon l'invention dans un mode de réalisation, le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ  
25 ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66 à SEQ ID NO:69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à  
30 SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; et au moins une séquence choisie parmi  
35 SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus

dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

5 Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins 4 sondes d'identifications choisies  
10 parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66 à SEQ ID NO:69, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins 5 sondes d'identification comprise  
15 entre SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie  
20 parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

25 Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66 à SEQ ID NO:69, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5  
30 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, et au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une  
35 quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie

parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61 à SEQ ID NO:75, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une séquence comprise entre SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:22, et SEQ ID NO:23 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5; SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23. et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 75 et tous fragments de

celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

5 Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 98, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO 76 à SEQ ID NO 96 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites  
10 séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une séquence comprise entre choisie  
15 parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Ces fragments nucléotidiques, dite séquences d'identification selon  
20 l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
*Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,  
25 *Enterovirus* : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*,  
*Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*,  
*Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A, *Calicivirus* : Norwalk et Sapporo Virus, *Adenovirus*, *Rotavirus*,  
30 *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, Genre *Mycobacterium*,  
*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*,  
*Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*,  
*Mycobacterium gordonae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Astrovirus*.  
35

Les Adenovirus, tel que Adeno virus 40, Adeno virus 41bis;



les *Astrovirus*, *HastV-1-2* ;  
les *Enterovirus*, tels que *Poliovirus*, *Coxsackievirus*, *Echovirus*,  
les *Rotavirus*,

les *Calicivirus*, tels que *Virus de Norwalk*, *Virus de Sapporo*, et  
5 les virus de l'Hépatite, tel que l'Hépatite A,  
le genre *Cryptosporidium*, tels que *Cryptosporidium parvum*,  
*Giardia lamblia* et les *Microsporidies*.

Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification  
selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en  
10 présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les  
microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*

Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification  
selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en  
15 présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les  
microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,  
*Clostridium perfringens*.

Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification  
20 selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en  
présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les  
microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Genre  
*Cryptosporidium*

25 Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification  
selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en  
présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les  
microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, *Enterovirus* et Genre *Cryptosporidium*.

30 Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification  
selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en  
présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les  
microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
35 *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus*  
*equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,

*Enterovirus* : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*,

- Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

- Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,  
 10 *Enterovirus* : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A, *Calicivirus* : Norwalk et Sapporo Virus, *Adenovirus*, *Rotavirus*.

- 15 Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

- Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
 20 *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus* : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*,  
 25 *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A, *Calicivirus* : Norwalk et Sapporo Virus, *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, Genre *Mycobactéries*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*,  
 30 *Mycobacterium gordonae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Astrovirus*.

- On pourra également concevoir et utiliser un nécessaire de détermination microbiologique selon l'invention comportant des séquences d'identification pour identifier des microorganismes au niveau des sérotypes, des sous-types et en épidémiologie.

Le procédé d'analyse d'un échantillon susceptible de contenir au moins une bactérie, parasite et/ou virus, selon l'invention utilise un mélange de séquences nucléotidiques comme sondes d'identification spécifiques d'un sérotype, d'un sous-type, d'une espèce ou au moins un genre de bactérie, virus et/ou parasite susceptible d'être présent dans l'échantillon.

Ce procédé d'analyse d'un échantillon selon l'invention est caractérisé par une étape de détection comprenant la mise en œuvre d'un nécessaire de détermination microbiologique tel que défini précédemment.

Dans un mode préférentiel d'exécution préalablement à l'étape de détection, on peut effectuer au moins une étape de lyse.

Dans un autre mode d'exécution, postérieurement à cette étape de lyse, on effectue une étape d'amplification.

L'invention concerne également un procédé de contrôle d'un échantillon liquide dans lequel préalablement à toute étape de détection une étape d'enrichissement en microorganismes dudit échantillon est effectuée.

Cette étape d'enrichissement peut être effectuée par filtration notamment en utilisant un moyen de filtration comprenant des fibres creuses et utilisé en mode frontal permettant d'obtenir dans un temps limité, à partir d'un échantillon liquide de départ de volume important et prédéterminé, un échantillon à analyser d'un volume suffisamment faible, tout en garantissant la viabilité des microorganismes, pour que les techniques d'analyse, notamment la multidétection selon l'invention, puissent être ensuite mises en œuvre.

Ce moyen de filtration est basé sur la technique de l'ultrafiltration sur fibres creuses en mode frontal.

Par mode frontal, par opposition au mode tangentiel, on entend tout passage en une passe d'un échantillon liquide de départ dans le moyen de filtration, sans recyclage d'au moins une partie du même échantillon à l'entrée dudit moyen de filtration.

L'utilisation de ce moyen d'ultrafiltration en mode frontal permet d'obtenir des concentrats de volume faible, d'effectuer la concentration d'un prélèvement dans une échelle de temps de l'ordre de l'heure au plus en un seul passage, tout en garantissant la viabilité des microorganismes, la multi-récupération et des rendements de l'ordre de 100 %.

Par multi-récupération, on entend la possibilité de récupérer dans l'échantillon final pratiquement tous les différents genres ou espèces de microorganismes présents dans l'échantillon de départ.

Ces rendements élevés sont obtenus en raison de l'inexistence de volumes, dits volumes morts, dus par exemple sur d'autres dispositifs à la présence de tuyauteries annexes, par exemple de recyclage, et par la fiabilité de la porosité sur toute la longueur de la fibre creuse.

- 5           Le procédé de contrôle selon l'invention, est ainsi appliqué sur un échantillon obtenu éventuellement par filtration, d'un volume compris entre 1 ml et 100 litres.

          Une étape de lyse des microorganismes est effectuée, soit par lyse mécanique soit par lyse chimique, telles que décrites précédemment.

- 10           Une étape de purification est éventuellement appliquée, en utilisant éventuellement les techniques de capture par des oligonucléotides fixés sur des particules magnétiques, ou par utilisation de colonnes de silice, de particules de silice (inerte ou magnétique), de colonnes échangeuses d'ions, ou de toute autre méthode citée précédemment.

- 15           Une étape d'amplification enzymatique est éventuellement appliquée également en utilisant préférentiellement les techniques de transcription telles que TMA, NASBA, mais en utilisant en particulier les techniques de PCR et RT-PCR.

- 20           Une étape de marquage de l'amplicon est appliquée, par utilisation préférentielle d'un marqueur fluorescent.

          Une étape d'hybridation est ensuite appliquée, en utilisant préférentiellement les sondes d'identification spécifiques ou leurs fragments fixés sur un support solide, et en particulier en utilisant une biopuce.

- 25           Le procédé de contrôle et le nécessaire de détermination microbiologique selon l'invention utilisant ces séquences spécifiques permet de détecter simultanément un bactérie et/ou un virus et/ou un parasite d'un panel fixe en une seule étape de multidétection finale.

          En fonction des liquides à analyser des panels fixes de microorganismes peuvent être facilement définis.

- 30           Un autre objet de l'invention est un procédé de production et/ou désinfection d'un liquide, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'analyse mettant en œuvre un nécessaire de détermination microbiologique selon l'une quelconque des revendications de 35 à 48 et générant un algorithme d'interprétation des données permettant l'asservissement dudit procédé de production et/ou désinfection auxdites données générées par le nécessaire de détermination microbiologique.
- 35

Les avantages de l'invention et les techniques mises en œuvre sont illustrés par les exemples non limitatifs et les figures en annexe.

5           **La figure 1** représente l'évolution du base-call sur les sondes spécifiques d'*Escherichia coli* et d'*Acinetobacter baumannii* en fonction du nombre de copies d'ARNr de chacun des partenaires ajoutées avant amplification.

10           La zone encadrée dans le graphique représente les proportions *E. coli*/A. *baumanii* à partir desquelles les cibles *E. coli* sont interprétables par la puce.

**La figure 2** représente l'évolution du base-call sur les sondes spécifiques d'*E. coli*, *S. typhimurium* et *A. baumannii* en fonction des proportions du nombre de copies de transcrits marqués représentant les 3 espèces.

15           Dans les exemples ci-dessous décrits les souches utilisées sont :

*Escherichia coli* ATCC 11775

*Enterococcus faecalis* 19433T

*Salmonella typhimurium* API 9810059

*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606

20

**Exemple 1 : Détection et identification d'une seule cellule bactérienne en culture : cas d'*Escherichia coli* (gram -) et d'*Enterococcus faecalis* (gram +)**

25           a) Préparation de la culture

On cultive une souche d'*E. coli* ou *E. faecalis* à 37°C dans 2 ml de bouillon Luria Bertani. Lorsque la culture a atteint une densité optique à 620 nanomètres de 0,2, on prélève 1ml. (10<sup>8</sup> bactéries/ml). On réalise des dilutions en série, jusqu'à avoir 0,1 cellule/µl.

30           b) Extraction et purification des acides nucléiques

1. Lyse des microorganismes

De la suspension à 0.1 cellules par microlitres, 10µl sont prélevés (1 cellule). Sur cette suspension, on ajoute 100µl d'un tampon de lyse contenant du Tris 10mM, de l'EDTA 1mM (dilution d'une solution TE100X commercialisée chez SIGMA, ref. T-9285) et du lysozyme (Sigma, ref. L-6876) dont la concentration est différente selon le Gram de la bactérie : 3 mg/ml pour

35

*E. faecalis*, 400 µg/ml pour *E. coli*. La lyse des bactéries s'effectue en laissant le tube contenant la suspension bactérienne en contact avec le tampon de lyse durant 5 à 10 mn à température ambiante.

2. Extraction et purification des acides nucléiques.

- 5 Cette étape s'effectue en utilisant le kit Rneasy mini kit commercialisé par Qiagen (ref. 74104) selon le protocole recommandé pour l'extraction et la purification des ARN totaux bactériens.

c) RT-PCR

- 10 Les deux étapes de RT et PCR vont s'effectuer l'un après l'autre, dans un seul tube, en utilisant le kit ACCESS (ref A1250, Promega).

Pour cela, on ajoute à 25 µl de la suspension d'ARN total le tampon 5X AMV/Tfl, 1mM de MgSO<sub>4</sub>, 200 µM de dNTPs (deoxyribonucleosides triphosphates), 5U d'AMV RT polymérase, 5U de Tfl polymérase, 5U de  
15 RNAsin (Pranega ref. NZIII), 0.5 µM des amorces eubactériennes A1.1 et S9T7 :

5'gaggcagcagtggggaat3'

5'taatacgcactcactatagggaggaggattactaccagggtatcta3' (en gras : promoteur de la polymérase T7),

- 20 afin d'obtenir 50 µl de volume réactionnel final.

Pour l'étape de RT, le mélange est mis à incuber 45 mn à 48°C, puis 5 mn à 94°C. Pour l'étape de PCR on réalise ensuite 35 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C 1 mn, 55°C 1 mn, 68°C 1 mn. Une extension finale de 7 mn à 68°C est ensuite réalisée.

- 25 d) Vérification de l'amplicification

On dépose 5 µl de produit d'amplicification (amplicon) sur un gel d'agarose 1,5% dans de l'EDTA-Tris Borate. Après une migration de 20 mn à 200V, on visualise la bande d'amplicification par coloration au Bromure d'Ethidium et par illumination aux UV. On montre que l'amplicification est positive  
30 par la présence d'une bande ayant la taille attendue (450 paires de bases).

e) Identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara)

- Une biopuce est synthétisée sur un support solide en verre selon le procédé décrit dans le brevet US 5 744 305 (Affymetrix, Fodor et al) en utilisant  
35 la stratégie de reséquençage décrite dans la demande WO 95/11995 (Affymax, Chee et al) et selon la méthode décrite par A Troesch et al. dans J. Clin.

Microbiol., vol. 37(1), p 49-55, 1999 avec les variantes suivantes : les oligonucléotides synthétisés sur la puce réalisent le reséquençage des séquences d'identification. Ce procédé permet de diminuer le nombre total d'oligonucléotides synthétisés et donc présentent un avantage considérable en  
5 terme de coût de production et sans compromis sur la qualité de l'identification des différents microorganismes de part le choix de ces séquences d'identification. Les oligonucléotides comportent 20 bases, avec une position d'interrogation en 12<sup>ème</sup> position par rapport à l'extrémité 3' de la séquence. Pour les espèces *E. coli* et *E. faecalis*, il y a également des oligonucléotides de  
10 17 bases, avec 2 positions d'interrogations : une en 10 et une en 8<sup>ème</sup> position. D'autres oligonucléotides ont des longueurs comprises entre 10 et 25 nucléotides. Les positions d'interrogation varient alors en fonction de la longueur de l'oligonucléotide.

L'analyse est effectuée sur le système complet GeneChip®  
15 (référence 900228, Affymetrix, Santa Clara, CA) qui comprend le lecteur GeneArray®, le four d'hybridation GeneChip®, la station fluidique GeneChip® et le logiciel d'analyse GeneChip®.

#### 1. Transcription et marquage des amplicons.

Grâce à l'amorce antisens S9T7, tous les produits d'amplifications  
20 présentent un promoteur pour la RNA polymérase T7. Ces amplicons vont alors servir de matrice à une réaction de transcription au cours de laquelle sera incorporé un ribonucléotide fluorescent.

A partir des 50µl de produit d'amplification positif, un aliquot (entre 2 et 12µl) est prélevé et ajouté à un mélange de transcription contenant les  
25 composants du kit Megascript T7 d'Ambion (ref. 1334) et de fluorescein-12-UTP (Roche, ref. 1427857). Le mélange réactionnel final se fait dans 20µl et la réaction de transcription s'effectue pendant 2 heures à 37°C.

#### 2. Fragmentation des transcrits marqués

Afin d'améliorer les conditions d'hybridation, les transcrits  
30 marqués sont clivés en fragments d'environ 20 nucléotides. Pour cela, les 20µl de transcrits marqués sont soumis à l'action de l'imidazole (SIGMA) 30mM et du chlorure de manganèse (Merck) 30mM pendant 30mn à 65°C.

#### 3. Hybridation sur la puce de recherche

A partir des 20µl de transcrits marqués et fragmentés un aliquot  
35 de 5µl est prélevé et ajouté à 700µl de tampon d'hybridation dont la composition est de SSPE 6X (Eurobio), DTAB 5mM (Sigma), Triton 0.5% (Merk

eulab). Ce mélange est hybridé sur la puce dans les conditions suivantes : 40 mn à 45°C. Après lavage, la puce est scannée, puis l'image d'hybridation obtenue est analysée par le logiciel Genechip® (Affymetrix, Santa Clara). Les spots d'hybridation permettent de reconstituer la séquence de l'amplicon, qui ensuite comparée aux séquences de références de la puce. La séquence (et donc l'espèce qui lui correspond) qui présente le meilleur pourcentage d'homologie (base-call, en %) avec la séquence de l'amplicon est retenue pour l'identification.

#### 4. Interprétation des résultats.

Seule une partie de la séquence de 450 bases est analysée. Elle correspond à tout ou partie des sondes d'identification représentées sur la biopuce. Le seuil d'interprétation, c'est à dire niveau d'identification est fixé à au moins 70% de base-call sur la séquence d'identification. En dessous de ce seuil, la cible n'est pas identifiée.

#### Résultats

L'ARN extrait d'une seule cellule bactérienne (*E. coli* ou *E. faecalis*) donne lieu à un produit d'amplification, puis à une identification correcte sur la biopuce.

#### Exemple 2 : Discrimination de mélanges de 2 espèces bactériennes différentes.

Dans cet exemple, la RT-PCR eubactérienne a été appliquées à des cibles synthétiques. C'est à dire que ces cibles proviennent de l'amplification, puis de la transcription de l'ADN ribosomal 16S dans son entier. Ces cibles sont appelées transcrits in-vitro. Dans cet exemple, la cible est un mélange de transcrits in-vitro représentant les espèces *Escherichia coli* et *Acinetobacter baumannii*. Quand on ajoute la cible au tube de RT-PCR, on ne résonne plus en terme de nombre de bactéries, mais de nombre de copies de transcrits in-vitro, puis en nombre d'équivalents-bactéries, en partant du postulat suivant : 1-bactérie correspond à  $10^4$  copies d'ARN ribosomal 16S.

Pour cela, les transcrits ont été dosés à  $10^{11}$  copies /  $\mu$ l. Pour *Acinetobacter baumannii*, la dilution  $10^8$  copies/ $\mu$ l est préparée. Pour *Escherichia coli*, les dilutions  $10^3$ / $\mu$ l,  $10^4$ / $\mu$ l,  $10^5$ / $\mu$ l et  $10^6$ / $\mu$ l sont préparées. Les conditions du mélange réactionnel pour la RT-PCR sont identiques à celles décrites dans



l'exemple 1, paragraphe c), sauf que le volume de cible n'est plus 25µl d'une suspension d'ARN total, mais 2µl d'un mélange constitué de 1µl de chaque dilution de transcript représentant chaque espèce dans les proportions suivantes :

5

Equivalents bactéries <i>E. coli</i> / <i>A. baumannii</i>	0/0	0,1/10 <sup>4</sup>	1/10 <sup>4</sup>	10/10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> /10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup> /0
Copies de transcripts d' <i>E. coli</i>	0	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
Copies de transcripts d' <i>A. baumannii</i>	0	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	0

L'unique amplicon obtenu est ensuite traité selon l'étape e) de l'exemple 1.

10

### Résultats

La figure 1 montre qu'en ramenant le nombre de copies d'ARNr 16S à un nombre de bactéries, il est donc possible de détecter, par utilisation de la puce à ADN, l'équivalent de 1 *E. coli* en présence de 10<sup>4</sup> *A. baumannii*, soit une proportion de 0.01%.

15

### Exemple 3 : Discrimination d'un mélange de 3 espèces bactériennes différentes

Des transcripts marqués de 3 espèces bactériennes (*Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Acinetobacter baumannii*) sont obtenus selon le protocole e) à f.1. Ils sont ensuite purifiés à l'aide du kit Rneasy mini kit (Qiagen, ref. 74104) selon le protocole adapté à la purification de transcripts in vitro. Les transcripts marqués sont dosés (lecture à 260nm sur un spectrophotomètre) de manière à connaître le nombre de cibles (ou copies) introduites dans le mélange d'hybridation. Le nombre total de copies dans un mélange d'hybridation est fixé à 10<sup>13</sup> copies.

25

Les transcripts correspondant aux espèces *E. coli* et *S. thyphimurium* sont en même nombre de copies. Ces transcripts ont été rajoutés par rapports aux transcripts d'*A. baumannii* de la façon suivante :

30

Proportion de <i>E. coli</i> - <i>S. thyphimurium</i> / <i>A. baumannii</i>	0.01%	0.1%	1%	10%	20%	50%
Nbre de copies de transcripts <i>E. coli</i>	5.10 <sup>9</sup>	5.10 <sup>9</sup>	5.10 <sup>10</sup>	5.10 <sup>11</sup>	10 <sup>12</sup>	2.5.10 <sup>12</sup>

Nbre de copies de transcrits <i>S. thyphimurium</i>	$5.10^8$	$5.10^9$	$5.10^{10}$	$5.10^{11}$	$10^{12}$	$2.5.10^{12}$
Nbre de copies de transcrits <i>A. baumannii</i>	$10^{13}$	$10^{13}$	$10^{13}$	$10^{13}$	$8.10^{12}$	$5.10^{12}$

### Résultats

La figure 2 montre que la détection d'*E. coli* se fait à des proportions plus faibles (1%) que celle de *S. thyphimurium* (10%). Ce résultat montre qu'il est possible de détecter sur la puce 3 espèces bactériennes différentes.

### Exemple 4 : détection simultanée d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enteritidis*

#### a) Préparation des suspensions bactériennes

Souches testées :

*Escherichia coli* ATCC 11775T

*Staphylococcus aureus* ATCC 12600T

*Salmonella enteritidis* ATCC 13076

Les souches sont cultivées dans un bouillon Trypase Soja à 37°C. Lorsque la culture atteint une densité optique de 0.2-0.3 ( $10^8$  bactéries/ml), on réalise des dilutions en cascade de  $1/10^{\text{ème}}$ , jusqu'à atteindre 100 bactérie/ml.

#### b) Mélange des bactéries

On mélange les 3 espèces bactériennes en utilisant les suspensions produites dans la partie a), de manière à avoir : 100 *Escherichia coli*, 100 *Staphylococcus aureus* et 100 *Salmonella enteritidis*.

#### c) Obtention des ARN totaux

##### 1. Lyse des microorganismes

Le volume final sera de 100µl. On rajoute 1µl de tampon TE100X (Sigma refT-9285), du lysozyme à 100mg/ml (Sigma, Ref.L-6876) pour avoir une concentration finale de 10mg/ml. On complète ou non avec de l'eau (Sigma, ref. W-4502) pour avoir 100µl. On incube 30 min à 25°C.

##### 2. Purification des acides nucléiques

41

On utilise ensuite le RNeasy Mini Kit (Qiagen, ref 74104) en appliquant le protocole préconisé par Qiagen pour les bactéries.

d) RT-PCR

- 5 On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. A1250) selon le protocole indiqué Exemple 1, partie c).

e) Vérification de l'amplification

- 10 Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie d).

f) Analyse sur une biopuce

1. Transcription et marquage des amplicons

- 15 Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-1.

2. Fragmentation des transcripts marqués

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-2.

3. Hybridation sur la puce

- 20 Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-3

4. Interprétation des résultats

- 25 Le base-call sur la séquence d'identification correspondant à chacun des taxons doit être supérieur à 90%. En dessous la cible n'est pas identifiée.

**Résultats**

Espèce testée	Base-call sur la séquence d'identification correspondante
Escherichia coli	100%
Staphylococcus aureus	100%
Salmonella enteritidis	100%

30

Conclusion

Il y a eu détection simultanée des 3 espèces bactériennes par hybridation sur les séquences d'identification correspondantes

- Exemple 5 : détection simultanée d'*Escherichia coli*,  
5 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa***

a) Préparation des suspensions bactériennes

- 10 Souches testées :  
Escherichia coli ATCC 11775T  
Staphylococcus aureus ATCC 12600T  
Salmonella enteritidis ATCC 13076  
15 Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145T

Les suspensions bactériennes sont préparées selon le protocole indiqué Exemple 4, partie a)

b) Mélange des bactéries

- 20 On mélange les 4 espèces bactériennes en utilisant les suspensions produites dans la partie a), de manière à avoir : 100 Escherichia coli, 100 Staphylococcus aureus, 100 Salmonella enteritidis et 100 Pseudomonas aeruginosa.

25 c) Obtention des ARN totaux

Selon les protocoles indiqués Exemple 4, partie c)

d) RT-PCR

- 30 On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. A1250) selon le protocole indiqué Exemple 1, partie c).

e) Vérification de l'amplification

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie d).

35 f) Analyse sur une biopuce

1. Transcription et marquage des amplicons

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-1.

2. Fragmentation des transcrits marqués

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-2.

3. Hybridation sur la puce

5 Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-3

4. Interprétation des résultats

Le base-call sur la séquence d'identification de chacun des taxons doit être supérieur à 90%. En dessous la cible n'est pas identifiée.

10

#### Résultat

Espèce testée	Base-call sur la séquence d'identification correspondante
<i>Escherichia coli</i>	100%
<i>Staphylococcus aureus</i>	91,9%
<i>Salmonella enteritidis</i>	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%

#### Conclusion

15 Il y a eu détection simultanée des 4 espèces bactériennes par hybridation sur les séquences d'identification correspondantes

20 **Exemple 6 : Détection simultanée d'*Escherichia coli*, *Cryptosporidium parvum* et du Poliovirus Sabin 3.**

a) Préparation des suspensions.

Pour *Escherichia coli*, les dilutions sont effectuées comme indiqué

Ex 4, a).

25 Pour *Cryptosporidium parvum*, des dilutions en cascades sont effectuées à partir d'une suspension d'oocystes titrée à  $10^7$ /ml, commercialisée par Waterborne Inc. (St Louis, USA).

Pour le Poliovirus Sabin 3 on utilise une suspension titrée à  $10^9$  PFU/ml

30

b) Mélange des microorganismes.

On mélange 3000 E. coli, 3000 C. parvum et 3000 cfu du Poliovirus de manière à obtenir 300 µl de volume final.

c) Préparation des acides nucléiques

5 Les 300µl sont séparés en 3X100 µl, car l'extraction et la purification des ARN subissent 3 processus séparés.

1. Escherichia coli

Préparation des ARN totaux selon le protocole indiqué EX 4, partie

c)

10 2. Cryptosporidium parvum

On utilise le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, ref. 74104) selon un protocole modifié. Pour cela, on ajoute aux 100µl 350 µl de tampon de lyse RLT du kit RNeasy, et 25 µl de Protéinase K à 19 mg/ml (Roche, ref. 1964372) ce qui ramène à 1 mg/ml. On laisse agir 30 mn à 65°C.

15 On continue ensuite selon le protocole RNeasy Mini Kit "for bacteria".

3. Pour Poliovirus Sabin 3

On rajoute 40µl d'eau (Sigma, ref. W-4502) aux 100µl, et on utilise le Qiaamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, ref. 52906), selon les instructions du  
20 fournisseur.

d) Amplification par RT-PCR

1. Escherichia coli

25 On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. A1250) selon le protocole indiqué Exemple 1, partie c).

2. Cryptosporidium parvum

On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. A1250).

30 Pour cela, on ajoute aux 25µl d'ARN total obtenu à l'étape b) 2, 25µl de mélange réactionnel de manière à avoir, dans les 50µl final : le tampon AMV/Tfi 1X, le MgSO4 2,5 mM, les dNTP 200 µM, 5U de Tfi, 5U d'AMV, 5U de RNAsin (Promega ref. N2111), et les primers XIA2F et XIA2R 200pM.

35 XIA2F 5' GGAAGGGTTGTATTATTAGATAAAG 3'

XIA2R-T7 5'

**taatacgcactcattataggaggaggattaAAGGAGTAAGGAACAACCTCCA 3'**

Tirés de la publi de Xiao et al. dans Applied and Environmental Microbiology, 1999

- 5 (en gras : promoteur T7 de la polymérase T7, qui sera utilisé lors de la transcription)

Pour l'étape de RT, le mélange est mis à incuber 45 mn à 48°C.

- 10 Pour l'étape PCR on incube 5 mn à 94°C, puis on réalise 30 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C 45 sec, 55°C 45 sec, 68°C 1 mn. Une extension finale de 7 mn à 68°C est ensuite réalisée.

3. Poliovirus Sabin 3

On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. A1250).

- 15 Pour cela, on ajoute aux 25µl d'ARN total obtenu à l'étape b) 2, 25µl de mélange réactionnel de manière à avoir, dans les 50µl final : le tampon AMV/Tfi 1X, le MgSO<sub>4</sub> 2 mM, les dNTP 300 µM, 5U de Tfi, 5U d'AMV, 5U de RNAsin (Promega ref. N2111), et les primers spécifiques 200pM.

- 20 Pour l'étape de RT, le mélange est mis à incuber 45 mn à 48°C. Pour l'étape PCR on incube 2 mn à 94°C, puis on réalise 40 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C 15 sec, 55°C 30 sec, 68°C 1 mn. Une extension finale de 7 mn à 68°C est ensuite réalisée.

- 25 e) Vérification de l'amplification  
Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie d).

f) Analyse sur une biopuce

- 30 1. Transcription et marquage des amplicons  
Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-1.

2. Purification des transcripts marqués.

- Les 3 tubes contenant les 20µl de transcription sont rassemblés la purification se fait en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen ref. 74104), protocole  
35 pour la purification de transcripts in-vitro. On obtient 20µl de transcript

3. Fragmentation des transcripts marqués et purifiés.

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-2.

### 3. Hybridation sur la puce

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-3

5

### 4. Interprétation des résultats

Le base-call sur la séquence signature d'E. coli et C. parvum doit être supérieur à 90%. Pour le Poliovirus 3, en raison d'un polymorphisme de séquence le seuil de détection se situe au dessus de 85%

10

### Résultat

Espèce testée	Base-call sur la séquence d'identification correspondante
Escherichia coli	100%
Cryptosporidium parvum	100%
Poliovirus Sabin 3	88,9%

15

### Conclusion

Il y a eu détection simultanée des 3 paramètres par hybridation sur les séquences d'identification correspondantes

20

### Exemple 7 : détection simultanée d'un Entérovirus (Coxsackievirus A9) et du virus de l'Hépatite A.

#### 1- Cibles considérées :

25

Souche de Coxsackievirus A9 à 7 TCID<sub>50</sub>/µL (extraction des acides nucléiques par utilisation du kit Qiamp Viral RNA de Qiagen -ref. 52904 -selon les indications du fournisseur)

Souche vaccinale du virus de l'Hépatite A à 17.5 DICC<sub>50</sub>/µL (extraction des acides nucléiques par utilisation du kit Qiamp Viral RNA de

30

Qiagen -ref. 52904- selon les indications du fournisseur)



## 2- RT-PCR multiplex

On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. A1250)

Pour cela, on ajoute 1  $\mu$ L de chaque souche virale et 48  $\mu$ L de milieu réactionnel de façon de la manière suivante :

	Concentration finale/tube
RNasine	2.5 U
Tampon 5X	1X
dNTP	0.3mM
Primers H1 +H2 <sup>(a)</sup>	0.5 $\mu$ M
Primers Enterovirus <sup>(b)</sup>	0.3 $\mu$ M
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
T4 gene 32 protein	2.5 $\mu$ g
AMV	5U
Tfi	5U

(a) : publication Robertson et al., Virus Research, 1989, 13, 207-

212

10 (b) : désignés dans la région 5'NCR

Pour l'étape de rétro-transcription, le mélange est incubé 45 minutes à 48°C. Après une étapes de dénaturation de 2 minutes à 94°C, les ADN complémentaires obtenus sont amplifiés selon les modalités suivantes :

15 45 cycles de [15 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, 45 secondes à 68°C] avec une étape d'élongation de 7 minutes.

## 3- Vérification de l'amplification

20 On dépose 8  $\mu$ L de produits de RT-PCR sur un gel de 1.5% d'agarose dans de l'EDTA-Tris-Borate. Après une migration de 30 minutes sous 100 V, on visualise des produits d'amplification par coloration du gel par du Bromure d'Ethidium et par illumination U.V.. La visualisation d'une bande vers 500bp (entérovirus) et d'une autre à 249bp (HAV) montrent que

25 l'amplification est effective.

## Analyse sur une biopuce

Le marquage des produits d'amplification s'effectue selon le brevet WO99/65926.

5

## Interprétation des résultats &amp; conclusions

Le base-call sur la séquence correspondante à chaque virus doit être supérieur à 95%. En dessous de ce seuil, la cible n'est pas identifiée.

10

On obtient les résultats suivants :

	% Base-Call
Coxsackievirus A9	96.7
HAV	96.9

## Conclusion

15

Il y a eu détection simultanée des 2 souches virale par hybridation sur les séquences d'identification correspondantes.

## REVENDECATIONS

1/ Procédé de contrôle de la qualité microbiologique d'un milieu aqueux environnemental, susceptible de comporter différents micro-organismes, caractérisé en ce que :

- on choisit un ensemble de référence, constitué d'au moins trois micro-organismes, représentatifs, ensemble ou séparément, d'un niveau de qualité microbiologique,
  - on dispose d'un nécessaire de détermination microbiologique, constitué d'au moins trois sondes d'identification respectivement spécifiques desdits trois microorganismes,
  - après traitement du milieu à analyser, on met lesdits microorganismes, ou toute fraction obtenue à partir de ces derniers, en contact avec ledit nécessaire de détermination, moyennant quoi on multi-détermine lesdits microorganismes,
- cette détermination étant représentative du niveau de qualité microbiologique du milieu.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins une sonde d'identification spécifique à une bactérie, au moins une sonde d'identification spécifique à un parasite et au moins une sonde d'identification spécifique à un virus.

3/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins quatre sondes d'identification spécifiques à au moins quatre bactéries différentes.

4/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins cinq sondes d'identification spécifiques à au moins cinq virus différents.

5/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins deux sondes d'identification spécifiques à au moins deux parasites.

6/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins une sonde d'identification spécifique à une bactérie et au moins une sonde d'identification spécifique à au moins un parasite.

7/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes :

*Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*.

8/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2,3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes :

*Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*.

9/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2,3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes :

*Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE 0157:H7, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, le genre *Mycobactéries*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae*, le genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, le genre *Salmonella*.

10/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3, 5 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Genre *Cryptosporidium*.

11/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3, 5 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Gardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*.

12/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3, 5 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes

suivants : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*,  
 5 genre *Giardia*, *Giardia lamblia*.

13/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants :

10 *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*,  
 15 genre *Giardia*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A, *Calicivirus* : Norwalk et Sapporo Virus, *Adenovirus*, *Rotavirus*.

14/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre  
 25 *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A, *Calicivirus* : Norwalk et  
 30 Sapporo Virus, *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, Genre *Mycobactéries*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia*  
 35 *cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Astrovirus*.

15/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, *Enterovirus*, *Genre Cryptosporidium*,

5 16/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 4, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :

*les Adenovirus*, *Adeno 40*, *Adeno 41bis* ;

*les Astrovirus*, *HAsV-1-2* ;

10 *les Enterovirus*, *Poliovirus*, *Coxsackievirus*, *Echovirus*,  
*les Rotavirus*,

*les Calicivirus* : *Virus de Norwalk*, *Virus de Sapporo* et  
*Virus de l'Hépatite A*.

15 17/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 5, 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les parasites suivants :

*Le genre Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *genre Giardia*,  
*Giardia lamblia* et *les Microsporidies*.

20 18/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2,3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes :

*Escherichia coli*, *Escherichia coli* *SEROTYPE O157:H7*, *genre Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *genre Mycobacterium*, *genre Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*.

25 19/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2 et 4, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :

*Virus de l'hépatite A*, *Enterovirus*, et au moins un virus choisi parmi  
*les Calicivirus* et *les Rotavirus*.

30 20/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2 et 4, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :

*Virus de l'hépatite A*, *Enterovirus*, et au moins un virus choisi parmi  
*le virus de Norwalk* et *les Rotavirus*.

21/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2 et 5, 6 caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les parasites suivants :

genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*,  
5 *Giardia Lamblia*.

22/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2,3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi :

*Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7, genre  
10 *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, genre *Mycobacterium*, genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, Virus de l'hépatite A, *Enterovirus*, et au moins un virus choisi parmi les *Calicivirus* et les *Rotavirus*, genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia Lamblia*.

15 23/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2,3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi :

*Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7, genre *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, genre *Mycobacterium*, genre  
20 *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, Virus de l'hépatite A, *Enterovirus*, et au moins un virus choisi parmi le virus de Norwalk et les *Rotavirus*, genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia Lamblia*.

24/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les  
25 sondes d'identification ont une séquence choisie parmi l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos :1-104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

30 25/ Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO :1 à SEQ ID NO :39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au  
35 moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ

- ID NO:40 à SEQ ID NO:49 , SEQ ID NO:63 à SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; et au moins une
- 5 séquence choisie parmi entre SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO 70 SEQ ID NO 104 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 10 **26/** Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins quatre sondes d'identification choisies parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites
- 15 séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 27/** Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins cinq sondes d'identification choisies parmi SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO 70
- 20 SEQ ID NO 104 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 28/** Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins deux sondes d'identification choisies parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49 et SEQ ID NO:63 à
- 25 SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 30 **29/** Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au
- 35 moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite



quelconque séquence, et au moins une séquence comprise SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

30/ Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO 66, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

31/ Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

32/ Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

33/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:46 à SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 et SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

34/ Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO:53 à

SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

5           **35/** Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à  
10           SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61 à SEQ ID NO:75, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque  
15           desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

**36/** Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification  
15           choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:104, et  
20           tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

**37/** Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification  
25           choisies parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:55 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

**38/** Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification  
30           choisies parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23.

**39/** Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification  
35           choisies parmi SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 75.

40/ Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisies parmi SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO 76 à SEQ ID NO 96.

5 41/ Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisies parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65

42/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, préalablement à la mise en contact avec le nécessaire de détermination, on effectue au moins une étape de lyse.

10 43/ Procédé selon la revendication 42, caractérisé en ce que, postérieurement à l'étape de lyse, on effectue une étape d'amplification.

44/ Procédé de contrôle selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par la mise en avant traitement du milieu à analyser, d'une étape d'enrichissement en microorganismes du dit échantillon.

15 45/ Procédé de contrôle selon la revendication 44, caractérisé en ce que l'étape d'enrichissement est effectuée par filtration.

46/ Procédé de contrôle d'un échantillon liquide selon la revendication 45, caractérisé en ce que la filtration est conduite en utilisant un moyen de filtration à fibres creuses, utilisé en mode frontal.

20 47/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO :63 à SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; et au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 104 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

48/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins quatre sondes d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

49/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins cinq sondes d'identification choisies parmi SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 104 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

50/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO :63 à SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

51/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO :61, SEQ ID NO :62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, et au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO :63 à SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

52/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID

NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO 68, SEQ ID NO 69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

- 5           **54/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un**  
microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend  
au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID  
NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID 68, NO SEQ ID 69, NO SEQ ID NO:15, SEQ ID  
NO:23, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, et tous fragments de celles-ci  
10 comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque  
desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité  
avec ladite quelconque séquence.

- 55/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un**  
microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend  
15 au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID  
NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID 68, NO SEQ ID 69, SEQ ID NO:15, SEQ ID  
NO:23, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci  
comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque  
desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité  
20 avec ladite quelconque séquence.

- 56/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un**  
microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend  
au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID  
NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID 68, NO SEQ ID 69, SEQ ID NO:53 à SEQ ID  
25 NO:55, SEQ ID NO 70 à SEQ ID 75, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous  
fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus  
dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au  
moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

- 57/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un**  
30 microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend  
au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID  
NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ  
ID NO:49, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55 SEQ ID NO:61 à SEQ ID NO:75, et  
tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus  
35 dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au  
moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

58/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

59/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:55 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

60/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

61/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO 59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 96, SEQ ID NO:98, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

62/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO :60, SEQ ID NO :97,

SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 96, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

- 5           **63/** Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont  
10 la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

- 64/** Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO  
15 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO :60 SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 96, SEQ ID NO :98 à SEQ ID NO :104, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères  
20 contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

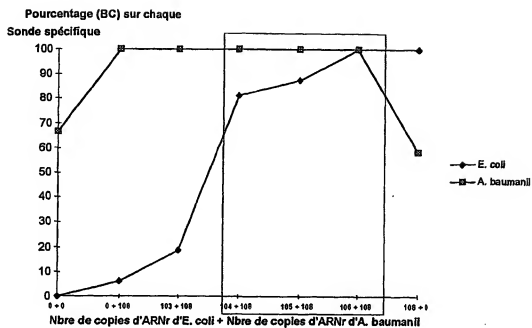
- 65/** Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO  
25 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO :60, SEQ ID NO :97, SEQ ID NO :70 à SEQ ID NO :75, SEQ ID NO 76 à SEQ ID NO 96, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de  
30 celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

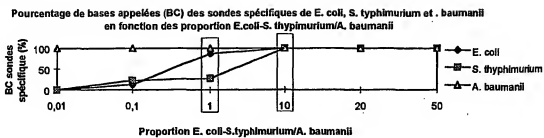
- 66/** Nécessaire de détermination microbiologique selon l'une quelconque des revendications 47 à 64, caractérisé en ce que les sondes  
35 d'identifications ou leurs fragments sont fixés sur un support solide.

**67/** Nécessaire de détermination -microbiologique selon l'une quelconque des revendications 47 à 65, caractérisé en ce que les sondes d'identification ou leurs fragments sont fixés sur un support solide et constituent une biopuce.

- 5           **68/** Procédé de production et/ou désinfection d'un liquide, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'analyse mettant en œuvre un nécessaire de détermination microbiologique selon l'une quelconque des revendications de 47 à 67 et générant un algorithme d'interprétation des données permettant l'asservissement dudit procédé de production et/ou
- 10   désinfection auxdites données générées par le nécessaire de détermination microbiologique.



**Figure 1**

**Figure 2**

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; BIOMERIEUX

<120> PROCEDE DE CONTROLE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE D'UN  
MILIEU AQUEUX ET NECESSAIRE APPROPRIE

&lt;130&gt; AQUAGENE B05B3650

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; FR00-08839

&lt;151&gt; 200-07-06

&lt;160&gt; 104

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Campylobacter coli

&lt;400&gt; 1

tttgtgaaat ctaatggcctt aaccattaaa ctgcttgag

39

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Campylobacter coli

&lt;400&gt; 2

atccgtagag atcaccaaga ataccatt

29

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Campylobacter jejuni

&lt;400&gt; 3

gtctcttctg aaatctaattg gcttaacat taaactgctt gggaaactga tagt

54

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Campylobacter jejuni

&lt;400&gt; 4

ggaaactcaac tgacgctaag gcgc

24

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 24

<400> 5  
gtgggttcagc aagttggatg tgaa 24

<210> 6  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 6  
aaactactga gctagagtac ggtagag 27

<210> 7  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 7  
tgttttgacg ttaccgacag aataagcacc ggcta 35

<210> 8  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 8  
tagagtatgg tagaggggtg tggaatt 27

<210> 9  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> *Legionella*

<400> 9  
atactgacac tgaggcacga a 21

<210> 10  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> *Legionella pneumophila*

<400> 10  
ttactgggagc tcaaggggtg gta 23

<210> 11  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> *Legi* .. ...

<400> 11  
ttaacctaac

<210> 12  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> *Acinetobacter baumannii*

<400> 12  
gcgtaggcgg cttattaagt cggatgt 27

<210> 13  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> *Acinetobacter baumannii*

<400> 13  
cattcgatac tggtagacta gagtatg 27

<210> 14  
<211> 47  
<212> ADN  
<213> *Escherichia Coli Shigella Species*

<400> 14  
cggggaggaa gggagtaaag ttaatacctt tgctcattga cgttacc 47

<210> 15  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> *salmonella*

<400> 15  
gaggaagggtg ttgtgggttaa ta 22

<210> 16  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> *Aeromonas caviae*

<400> 16  
cagtagctaa tatctgctgg ctgtgacgtt ac 32

<210> 17  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> *Aeromonas hydrophila*

<400> 17  
acgcaggcgg ttggataagt tagatgtgaa ag 32

<210> 18  
<211> 20  
<212> ADN

<400> 18  
aattgcattt aaaactgtcc 20

<210> 19  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> *Aeromonas sobria*

<400> 19  
gaaaggttgg cagctaatat ctgtcagctg tgacg 35

<210> 20  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> *Aeromonas sobria*

<400> 20  
aattgctgtt cagctagagt cttgta 26

<210> 21  
<211> 53  
<212> ADN  
<213> *Vibrio cholerae*

<400> 21  
cagtagggag gaaggtggtt aagttaatac cttaacatt tgacgttacc tac 53

<210> 22  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> *Vibrio cholerae*

<400> 22  
tcaacctagg aatgcattt gaaactgaca agctagagta ctgtagag 48

<210> 23  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 23  
gttattaggg aagaacatat gtgtaagtaa ctgtgca 37

<210> 24  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 24  
tattagggaa

<211> 23  
<212> ADN  
<213> streptococcus bovis streptococcus equinus  
-  
<400> 25  
ttggaaactg ttagacttga gtg 23

<210> 26  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Enterococcus faecalis  
-  
<400> 26  
aagaacaagg acgttagtaa ctgaacgtcc cctgacggta tct 43

<210> 27  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Enterococcus faecium, hirae, durans  
-  
<400> 27  
agagtaactg ttcattccctt gacggta 27

<210> 28  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Clostridium perfringens  
-  
<400> 28  
agcgtaggcg gatgattaag tgggatgtg 29

<210> 29  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Clostridium perfringens  
-  
<400> 29  
gtgctgcatt ccaaaactggt ta 22

<210> 30  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Mycobacterium sp.  
-  
<400> 30  
gcgtgcgggc gatacgggca gact 24

<210> 31  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Mvcol

aagggtcggg ttttctcgga ttgac 25

<210> 32  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> *Mycobacterium kansasii*

<400> 32  
gtccgggttc tctcggttg acggtaggt 29

<210> 33  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> *Mycobacterium gordonae*

<400> 33  
gttttctcgg gctgacgga gg 22

<210> 34  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> *Mycobacterium marinum*

<400> 34  
aggttcgggt tttctcggt tgac 24

<210> 35  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> *Mycobacterium xenopi*

<400> 35  
ctttcagcct cgacgaagct 20

<210> 36  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> *Mycobacterium xenopi*

<400> 36  
gtgacggtag gggcagaaga ag 22

<210> 37  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> *Burkholderia gladioli*

<400> 37  
ccggaaagaa



<212> ADN  
<213> Burkholderia cepacia

<400> 38  
actgcattgg tgactggcag gctag 25

<210> 39  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Stenotrophomonas maltophilia

<400> 39  
gaggaacatc catggcgaag gcagctacct ggaccaaca 39

<210> 40  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Cryptosporidium

<400> 40  
cagttatagt ttacttgata atc 23

<210> 41  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Cryptosporidium

<400> 41  
ttattagata aagaaccaat 20

<210> 42  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Cryptosporidium

<400> 42  
acctatcagc tttagacggt agggat 27

<210> 43  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Cryptosporidium

<400> 43  
tgccttgaat actccagcat ggaataa 27

<210> 44  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Crypt

<210> 45  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Cryptosporidium parvum  
 .  
 <400> 45  
 tcattataac agttatagtt tacttgataa tcttt 35  
  
 <210> 46  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Cryptosporidium parvum  
 <400> 46  
 attggaatga gttaagtata aaccccttta caagatcaa ttg 43  
  
 <210> 47  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Cryptosporidium parvum  
 <400> 47  
 tagttggatt tctgttaata atttatata 29  
  
 <210> 48  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Cryptosporidium parvum  
 <400> 48  
 atatttatat aatattaaca taattcatat tactat 36  
  
 <210> 49  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Cryptosporidium parvum  
 <400> 49  
 ttctgaagga aatgggtaat cttttgaata tgcategtga t 41  
  
 <210> 50  
 <211> 382  
 <212> ADN  
 <213> Adenovirus 40 (I19443)  
 <400> 50  
 ctaaaggga  
 ctaacctgtg )  
 cgccgccct )  
 gctatcata )

aatcatatta gggtatatcc ag

382

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 382

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Adenovirus 41 bis (M18289)

&lt;400&gt; 51

ctgaaggga ctcgccagtgt taagcataat atgattttgtg gcaactgggtca ctctcagctg 60  
 ctaactttgcg cagatggaaa ctgtcagact ctaaaaagtga ttcatgtgtt ttcccatcag 120  
 gcgcgcacct ggctgttttt tgagcataac atgcttatgc gttgtaccat gcattttggg 180  
 gctcgtcgtg catgtgtttt tccatatcag agtaattttt gccatactaa agttttaatg 240  
 gaaaactgatg ctttttcgcg ggtgtgggtg agcgggggtg ttgatttgac catagagctg 300  
 tataaagtgg tgagatatga tgagttaaag gctcgtttgc gccctgtga gtgtggagcc 360  
 aatcacatca gggtatatcc ag 382

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 67

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Astrovirus HAstV-1-2 (L23513)

&lt;400&gt; 52

aggggtacag ttccttcttt tctgtctctg tttagattat tttaatcacc atttaaaatt 60  
 gatttaa 67

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 521

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Poliovirus (X00595)

&lt;400&gt; 53

cggtaccttt gtgcgcctgt tttatactcc cctcccgcaa cttagaagca cgaaccaaag 60  
 ttcaatagaa gggggtacaa accagtacca ctacgaacaa gcacttctgt ttccccggtg 120  
 acattgcata gactgctcac ggggttgaaa gtgatcgatc cgttacccgc ttgtgtactt 180  
 cgaaaagcct agtatgcctc tggaaatcttc gacgcgttgc gctcagcacc cgaccccggtg 240  
 gtgtggctta ggctgatgag tctggacatt cctcacgggt gacggtgtgtc taggtgtcgt 300  
 ttgcygccta cctatggcta acgcataagg acgtttagat tgaacaaggt gtgaagagcc 360  
 tattgagcta cataagagtc ctccggcccc tgaatgcggc taatcctaac caggaacag 420  
 gcygtcgaga accagtgact ggcttgtcgt aacgcgcaag tctgtggcgg aaccgactac 480  
 ttgtgggtgc cgtgtttcct gttattttta tcatggctgc t 521

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 520

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Coxsackievirus (D00538)

&lt;400&gt; 54

aggtaccttt gtacgcctgt tttatatccc ttccccgta actttagaag cttatcaaaa 60  
 gtccaatagc aggggtacaa gccagtacct ctacgaacaa gcacttctgt ttccccggtg 120  
 aaatcatata 0  
 cgagaagcct 0  
 tgtagcttag 0  
 acnnacctac 0

ttgggtgtcc gtgtttccct ttatatccat actggctgct 520

<210> 55  
<211> 525  
<212> ADN  
<213> Echovirus (X77708)

<400> 55  
cggtaccttt gtgcgcctgt tttatatacc ctccccctag taacctagaa gttcatcaca 60  
aatgatcaat agtttagctca acaaaccagt tgagcctaga tcaagcactt ctgttacccc 120  
ggctcgagta tcaataagct gtgtcacagg ctgaaggaga aaacgccctg taccgcacca 180  
gctactctcg agaaccctagt atcaccatag aggttgctga gctgttctcg ccgcacaacc 240  
ccaagttaga tcaagtcgat ggtcacccag gttccccaca ggcgactgtg goggtggctg 300  
cgttggcggc ctgcccattg ggttaccatc gggacgcttc aatactgaca tgggtggaag 360  
agttagctga gctagctggt agtcctccgg ccctggaatg cggctaatec taactgtgga 420  
gcaagtgcc acaaccctgt ggttggcttg tcttaattgg caactctgca gcggaaccga 480  
ctactttggg tgaccgtgtt tctctttatt cttatattgg ctgct 525

<210> 56  
<211> 981  
<212> ADN  
<213> Rotavirus U36242

<400> 56  
atgtatggtta ttgaatatac cacaattctg accattttga tttttatcat attattggaat 60  
tatatatctaa aaactataac taatacagatg gactatatag tttttaaatt ttgtcacta 120  
atcgctctga tgtcacattt tgtaaggagc caaaattatg gcatgtattt accaataaca 180  
ggatcactag acgctgtata cacaaattca actagtggag aatcatttct aactccaacg 240  
ctatgtttat actatccaac agaagctaaa aatgagattt cagataatga atgggaaaaa 300  
actctatcag aattattttt aactaaagga tggccggctg gatcagttta ttttaaagac 360  
taacatgata ttactacatt ttctatgaat ccacaactgt atgtgtatta taatgtagta 420  
ttgatagat atgataatac atctgaatta gatcatcgg agttagcaga tcttatktg 480  
aacgaaatgc tgtgcaatcc tatggatata tcaatttact attatcaaca aaatagcgaa 540  
tcaaaccaat ggaatatcaat cggaaacagc tgtacggtaa agtttgtcc actcaataca 600  
caactctag gaattggatg caaaactacg gacgtggata catttgagat tgttgcgtg 660  
tctgaaaaat tggtaattac tgatgttgta aatggtgtaa accataaat aaataattca 720  
ataagtaaat gtactatacg taattgtaat aaactaggc caagagaaaa tgttgcata 780  
attcaagttg gtggaccgaa cgcactagat atcaactgctg atccacaac agttccacag 840  
gttcaangaa ttatggcagt aaattggaaa aaatggtggc aagtgtttta taccagtagtt 900  
gactatatta accaaattat caaagttatg tccaaacggt caagatcatt agacacagct 960  
gctttttatt atagaattta g 981

<210> 57  
<211> 981  
<212> ADN  
<213> Rotavirus M86834

<400> 57  
atgtatggtta ttgaatatac cacagttcta ttttatttga tatcgttgtt tcttgtgagt 60  
tactattttta aaaccataac gaaaatgatg gactatatta ttatatagat aacttttata 120  
attgttgtat tttatattct gtgtatccgc caaaattatg tttatatttt tttatatttt 180  
ggatctatgg 0  
ctatgtctat 0  
acattatctc 0

```

aatgaatggt tgtgtaatcc aatggatata acgctatatg attatcaaca aactggagaa 540
gcaataaat ggatatcaat gggatcatct tgtactgtca aagtgtgccc attaataacg 600
caaaccttag gaattggctg ccaaacacacg aatgtagtcta cttttgaaat ggtggctgac 660
agtgaaaaac tagcgatagt tgatgttgtt gataatgtaa atcataaatt agatattaca 720
ctctcaacgt gtacaatagc aaattgttaag aaattagtgc caagagaaaa tgtggctata 780
atacagggtg gtggtttctaa tatactagat ataacggctg atccacgac tccaccgcaa 840
acggaacgaa tgatgogtgt taattggaaag aatgtgtggc aagtatttta cactgtagtt 900
gattatatta atcagatagt acaaatgatg tccaaaagat cgaggtcgct agattcatcc 960
tccttttatt atagagtata g 981

```

<210> 58  
 <211> 981  
 <212> ADN  
 <213> Rotavirus U26395

```

<400> 58
atgtatggtt ttgaatatac cacaattcta atctttctga tatcaatcat cctactcaac 60
tatatataat aatcagtgac ccgaataatg gactacatta tatatagatt tttattaatt 120
tcgtagcat tatttgcctt aactaaagct cagaactatg gaacttaatt accaataaca 180
ggatcaatgg acactgttta ctccaaactct actcaagaag gaattattct aacatccaca 240
ttatgtttgt attatccnac tgaagcaagt actcaaatca gtgatgggtg ttggaaaagac 300
tcattatcac aaattgtttct taaaaaaggt tggcacaacg gatcagctca ttttaaaagag 360
tactcaaatata ttgttgactt tccogttgat ccacaattat attgtgatta taacttagta 420
ctaataaggt atgatcaaaa tcttgaacta gatagtgcag aattagctga ttgtgatttg 480
aatgaatggc tatgtaatcc aatggatata acattatatt attatcaaca atcggggagaa 540
tcaaaatagt ggatatcaat gggatcatca tgtactgtga aagtgtgtcc actgaataca 600
caaacgttag gaatagggtt tcaaacacacg aatgtagact caattgaaac ggtgtgtgaa 660
aatgaaaaat tagctatagt ggatgtcgtt gatgggata atcataaaat aaatttgaca 720
actacgacat gtactattcg aaattgtaag aagttaggtc caagagagta tgtagctatc 780
atacagaatt gtggctctaa tatattagac ataacagogg atccagcgac taatccacaa 840
attgagagaa tgatgagagt gaattggaag agatgtgtgc aagtatttta taccatagta 900
gattatatta atcagatgtg acaggtgatg tccaaaagat caagatcatt aaattctctga 960
gcttttatt atagagtata g 981

```

<210> 59  
 <211> 398  
 <212> ADN  
 <213> Virus de Norwalk (M87661)

```

<400> 59
ataaaagtgt gcatgaacac aatagaagat ggccccctca tctatgctga gcatgctaaa 60
tataagaatc attttgatgc agattataca gcatgggact caacacaaaa tagacaaatt 120
atgacagatc cctctcccat tatgtcggcg cttacggcct caccagaatt ggcagagttt 180
gtggcccaag atttgcctag accatctgag atggatgtag gtgattatgt catcagggctc 240
aaagaggggg tgcacatctgg attcccatgt actcccgagc tgaacagcat aaatcactgg 300
ataattactc tctgtgcact gtctcgagcc actggtttat cacctgatgt ggtgcaatcc 360
atgcatattt tctcatattta tgggtgatgat gagattgt 398

```

<210> 60  
 <211> 247  
 <212> ADN  
 <213> Hepat

<400> 60

ccatgaaga ttgaaagga aaagctaaca gagggaaaat ggatgtttca ggagtacaag 180  
 caactgtggg agctatcaca acaattgagg atccagtttt agcaaagaaa gtacctgaga 240  
 catttcc 247

<210> 61  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> *Enterococcus faecalis*

<400> 61  
 tctcaatcac tggacgtggt actgttgcta caggacgtgt tgaacgtggt gaag 54

<210> 62  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

<400> 62  
 tctccatctc cggtcgtggt accgttggtta ccggtcgtgt agaacgcggt atc 53

<210> 63  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> *Cryptosporidium parvum*

<400> 63  
 tctcaactgt aacttcacgt g 21

<210> 64  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> *Cryptosporidium parvum*

<400> 64  
 tgtgattggt aaaaagtata g 21

<210> 65  
 <211> 164  
 <212> ADN  
 <213> *Giardia lamblia*

<400> 65  
 ggaatgtctt gtaggcgccc gcccccacgc gcgcgcggat cgcgccctgc cccttgata 60  
 caccgcctgt cgctctacc gactgggcgc ggcggcgagc gccccggacg cgcgaaggcg 120  
 cgcgagcccc gcgcctgga ggaaggagaa gtctgaacaa ggta 164

<210> 66  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> *Esche*

<210> 67  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Enterococcus faecalis

<400> 67  
actgaacgtc cctgacggt atct

24

<210> 68  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli O157 :H7

<400> 68  
tggatcgcca aaactgtgga attgagcagc gttggtggga aagcgcgtta c

51

<210> 69  
<211> 81  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli O157 :H7

<400> 69  
tgtgggcatt cagtcctggat cgcgaaaact gtggaattga gcagcgttgg tgggaaagcg 60  
cgttacaaga aagccgggca a 81

<210> 70  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Poliovirus type 2

<400> 70  
ctcgggcccc tgaatgcggc taatcctaac

30

<210> 71  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Poliovirus type 2

<400> 71  
accagtgaact ggcttgcgt

20

<210> 72  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Coxsackievirus A21

<400> 72  
tcgggcccct

<212> ADN  
<213> Coxsackievirus A21

<400> 73  
ccagtgcagta ggtgtgcgta

20

<210> 74  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Echovirus 12

<400> 74  
agtctctcggg cccctgaatg cggctaatacc

30

<210> 75  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Echovirus 12

<400> 75  
acaacccagtg ggggtgcttg

20

<210> 76  
<211> 1061  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 76  
ggctttaaaa gagagaattt cggtttggtc agcgggttagc tccctttaat gtatggtatt 60  
gaataatacca caattctaac cttctcgata tcaatagttt tattgaacta tatattaaaa 120  
tcactaacta gtgcgatgga ctttataatt tatagatttc ttttacttat tgttattgca 180  
tcaccttttg ttaaaacaca aaattatgga attaatctac cgatcactgg cttccatggat 240  
acagcatatg caaattcatc acagcaagaa acatttttga cttcaacyct atgcttatat 300  
tatctctacag aagcgtcaac tcaaatgga gatcacagaat ggaaggatc tctgtcccaa 360  
ttattcttga cttaaagggtg gccaaactga tcagctctatt ttaaagaata caccgatata 420  
cgcttcattct caattgatcc gcaactttat tgggattata atgtgttact gatgaagtat 480  
gattcaacgt tagagctaga tatgtctgaa ttatgctgatt taattctaaa tgaatggtta 540  
tgtaacccaa tggatataac attatattat tatcagcaaa cagatgaagc gaataaatgg 600  
atctcgatgg gacagtccttg taccataaaa gtatgtccat tgaatacgca gaatttagga 660  
ataggttgta ttaccacaaa tacagcgaca tttgaagagg tggctacag tgaataaata 720  
gtaataacgg atgtgttgga tgggtgtgaa cataaacttg atgtgactac aatcactctg 780  
acaattagga atgtgaagaa gttgggacca agagaaaatg tagcgattat acaagtcggt 840  
ggctcaagatg tgttagatat tacagcggat ccaactactg caccacaaac tgaacgtatg 900  
atgcgagtaa atgtgaagaa atgggtggcaa gttttctata cagtagtaga ttatattaat 960  
cagattgtgc aagttatgtc caaagatcca cggtcattaa attcagcagc tttttactat 1020  
aggggtttgat atatcttaga ttagaattgt atgatgtgac c 1061

<210> 77  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Rota

<400> 77



<210> 78  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 78  
aatacatctg aattagatgc a

21

<210> 79  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 79  
caaacaaatg gatcatcat

19

<210> 80  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 80  
ggttcaaga attatgcgag taaattggaa aaaatggtgg caagt

45

<210> 81  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 81  
ctttttatta tagaatttag

20

<210> 82  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 82  
tttatagagt aacttttata attgttgtat

30

<210> 83  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 83  
tctggagagg agttggatat a

21

<210> 84  
<211> 19

<400> 84 caaataaatg gatatcaat	19
<210> 85 <211> 45 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 85 aacggaacga atgatgcgtg ttaattggaa gaaatggtgg caagt	45
<210> 86 <211> 20 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 86 ctttttatta tagagtatag	20
<210> 87 <211> 30 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 87 tatatagatt tttattaatt tctgtagcat	30
<210> 88 <211> 21 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 88 caaaatcttg aactagatat g	21
<210> 89 <211> 19 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 89 caaataagtg gatatcaat	19
<210> 90 <211> 45 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 90 aattgaaga	

<210> 91  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 91  
ctttttatta tagagtatag

20

<210> 92  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 92  
tttatagatt tcttttactt attgttattg

30

<210> 93  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 93  
tcaacgttag agctagatat g

21

<210> 94  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 94  
cgaataaatg gatatcgat

19

<210> 95  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 95  
aactgaaagt atgatgcgag taaattggaa gaaatggtgg caagt

45

<210> 96  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 96  
ctttttacta tagggtttga

20

<210> 97  
<211> 64  
<212> ADN

## 18

<400> 97  
 atggatgttt caggagtaca agcacctgtg ggagctatca caacaattga ggatccagtt 60  
 ttag 64

<210> 98  
 <211> 551  
 <212> ADN  
 <213> Sapporo Virus

<400> 98  
 tgtgatgtg ccaccaogct tatagccacc gcggctttta aggcogtgcc taccaggcta 60  
 caggtgtgta caccaatgac accagttgct gttggcatta acatggactc tgttcagatg 120  
 caagtgtatga atgactcttt aaaggggggt gttctttact gtttgatta ttccaaatgg 180  
 gatccacac aaaacccctg agtgacagca gccctccctg caataattgga gagatttgc 240  
 gagcccatc caattgtgtc ttgtgccatt gaggtctctt cctccctgc agagggctat 300  
 gtcaatgata tcaaatgtt gacacggcgg gccctaccat ctgggatgcc atttaccatc 360  
 gtgctcaatt ctatcaacca tatgatatac gtggcgggcag ccactctgca ggcatacgaa 420  
 agccacaatg tcccatatac tggaaacgtc ttccaagtgg agaccgttca caggtatggt 480  
 gatgattgca gtacagcgt gtgcctgcc actgcatcaa ttttccacac tgtgttgca 540  
 aacctaacgt c 551

<210> 99  
 <211> 382  
 <212> ADN  
 <213> Southampton Virus

<400> 99  
 tcaaaagttgg aatgaattca attgaggatg ggccactgat ctatgcagaa cattcaaaa 60  
 ataagtacca cttttagtga gattacacag ctggggactc aactcaaaa aggcataatca 120  
 tgacagagtc attttcaatc atgtgtcggc taactgcac acccgaaacta gcttcgggtg 180  
 tggctcaaga cttgctgcga cctcagaga tggatgttgg cgactacgtc ataagatga 240  
 aggaaggcct cccatctggt ttcccatgca catcacaagt taatagtata aaccattggt 300  
 taataactct gtgcgccctt tctgaagtga ctggcctgct gccagacgtt atccaatca 360  
 tgtcatattt ctctttctat gg 382

<210> 100  
 <211> 312  
 <212> ADN  
 <213> Desert Shield Virus

<400> 100  
 ttgatgtgtg attacacggc ctgggattcc actcaaaaca gggaaatcat gatggagtcc 60  
 tttaacatca tgtgtaaact cactgccaac cctccctgg ctgcggtagt ggcacaagac 120  
 ttactttctc cttctgaaat ggatgttggga gattatgtaa tcagtgtgaa agacggcctg 180  
 ccacaggctc cccctgttac ctcaacaagt aacagcataa atcactggat tctcacctg 240  
 tgtgcattgt cagaagtcac ogggtctctc ccagatgtgt tgcagtcaca gtctgatttt 300  
 tctttctatg gg 312

<210> 101  
 <211> 362  
 <212> ADN  
 <213> Toronto Virus

<400> 101  
 aatgaagatg gtcccataat atttgagaaa cattccagat acagatacca ctatgatgca 60

gattactccc gctgggactc cagcgagcag cgggcaagtgc tggcagcagc acttgaaatc 120  
 atgggtgaggt tctctgctga accacagcta gcacaaatag tagctgaaga cctgctagca 180  
 ccaagtgtgg ttgatgtggg tgacttcaag atcaccatta atgaaggcct acctkctggt 240  
 gtgccttgca cctcaagtg gaactccatt gcccaactggt tgcttactct gtgtgccctt 300  
 tctgaagtta caggactagg ccccgacatc atacaagcta attctatgta cttctttctat 360  
 gg 362

<210> 102  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Snow Mountain Virus

<400> 102  
 tgaatgagga tggaccata atttttgaa agcactccag gttctcacc cactatgatg 60  
 cagattactc acgtggggac tcaacccaac agagggcagt gctagctgca gccttggaaa 120  
 tcatggtaaa attctcacca gaaccacatt tggcccaaat gtgtgcagag gatctcctag 180  
 cccccagtg gatggatgta ggtgatttca aaataacaat taatgaggga ctgcctctgg 240  
 gagtaccctg cacatcacag tggasttcca tcgcccactg gctcctcaca cttctgtgac 300  
 tatctgaagt cacaacactg gctcctgaca tcatacaagc taactccttg tctctttctc 360  
 atgg 364

<210> 103  
 <211> 376  
 <212> ADN  
 <213> Hawaii Virus

<400> 103  
 tcagagtgg tatgaacatg aatgaggatg gccccattat ctttgagaaa cactccaggt 60  
 ataaatata ttaagattat tctcgatggg actcaacaca gcagagagcc gtactagtctg 120  
 cagccotaga gatcatggtc aaattctccc cagagccaca ctgggccagg gtatgttgca 180  
 aagaccttct tcccccaagt gtgatggatg tgggtgactt caagatatca atcaacgagg 240  
 gtcttccctc tgggggtgcc tgcaacctgc aatggaactc catcaccac tggtcctccta 300  
 ctctttgtgc actctctgaa gtcacggacc tgtccctgga catcattcaa gccaatctct 360  
 tattctcttt ctatgg 376

<210> 104  
 <211> 382  
 <212> ADN  
 <213> Bristol Virus

<400> 104  
 tcagagtgg catgaatatg aatgaggatg gccccatcat cttcgagaga cactccagat 60  
 acaagtatca ctatgatgct gactactctc ggtgggattc aacacacaa agggccgtgt 120  
 tagcgacagc cctagaatac atggttaaat tctccccaag accgcatttg gccagatag 180  
 tgcagaaga ccttctatct cctagtgtga tggatgtggg tgacttcaaa atatcaatca 240  
 atgaggccct tccctctggt gtgcctctga cctctcaatg gaattccatc gcccactggc 300  
 tctcactctc ctgtgcactc tctgaagtta caaacctgtc ccttgacatc atacaggcta 360  
 attccctctt tctctctat gg 382